
Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
und dem
Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen
in der Veterinärmedizin
Klinik für Schweine
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
(Leiterin: Univ. Prof. Dr. med. vet. Isabel Hennig-Pauka)

Angefertigt unter der Leitung
von Univ. Prof. Dr. med. vet. Mathias Ritzmann

Nachweis des porzinen reproduktiven und respiratorischen
Syndrom Virus in Serum- und in Speichelproben

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Mag. med. vet. Robert Sebastian Graage
aus Essen

München 2014

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

Tag der Promotion:

08. Februar 2014

Meinen Eltern

“Saliva is not one of the popular bodily fluids. It lacks the drama of blood, the sincerity of sweat and the emotional appeal of tears.” Irwin D. Mandel (1990)

Das Promotionsprojekt wurde durch den Verein Steirischer Tiergesundheitsdienst, Graz, Österreich und den Verein der Freunde und Förderer der Schweinemedizin, Wien, Österreich unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1. PRRSV.....	3
2.1.1. Ätiologie, genomische Struktur des PRRSV und Pathogenese	3
2.1.2. Übertragung des PRRSV	5
2.1.3. Klinische Symptome und pathologische Veränderungen einer PRRSV- Infektion	6
2.1.4. PRRSV-Diagnostik.....	8
2.1.5. Überwachungsprogramme PRRSV	10
2.2. Speichelproben	11
2.2.1. Speichel des Schweines	11
2.2.2. Geschichte der Speichelproben	13
2.2.3. Speichelproben beim Schwein.....	15
2.2.4. Speichelproben zum Nachweis des PRRSV.....	17
3. Material und Methode	19
3.1. Studienaufbau	19
3.2. Effekt der Lagerungszeit und -temperatur auf den Nachweis PRRSV- spezifischer Genomfragmente.....	20
3.2.1. PRRSV Typ 1.....	21
3.2.2. Herstellung der Reagenzlösungen.....	22
3.3. Studienbetriebe	22
3.4. Probenmaterial.....	23
3.4.1. Gewinnung der Speichelproben.....	23
3.4.2. Gewinnung der Serumproben.....	25
3.5. Tier-Kaustrick-Interaktion	26
3.6. Labordiagnostische Verfahren	27
3.6.1. Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper im Serum.....	27

Inhaltsverzeichnis

3.6.1.1. Testprinzip	28
3.6.2. Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper im Speichel	29
3.6.2.1. Durchführung Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper im Speichel mittels HerdChek® PRRS X3	29
3.6.3. Extraktion viraler RNA aus Serum und Speichelproben	30
3.6.3.1. Kontrollen	30
3.6.3.2. Durchführung der RNA Extraktion	31
3.6.4. Untersuchung auf PRRSV-spezifische Genomfragmente mittels qRT- PCR	32
3.6.4.1. Kontrollen	32
3.6.4.2. Spezifische Primerpaare	32
3.6.4.3. Durchführung der qRT-PCR	33
3.6.5. RT-PCR zum Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente	34
3.6.5.1. Kontrollen	34
3.6.5.2. Spezifische Primerpaare	35
3.6.5.3. Herstellung des Mastermixes	35
3.6.5.4. Template-Zugabe	35
3.6.5.5. Durchführung der RT-PCR	36
3.6.6. Gelelektrophorese	36
3.6.6.1. Herstellung Agarosegel	36
3.6.6.2. Durchführung der Elektrophorese	37
3.6.6.3. Fotodokumentation	37
3.6.6.4. Auswertung	38
3.7. Statistische Auswertung	39
4. Ergebnisse	41
4.1. Tier-Strick-Interaktion	41
4.2. Effekt der Lagerungszeit und -temperatur auf den Nachweis PRRSV- spezifischer Genomfragmente	43

4.3. Ergebnisse Betriebe	45
4.3.1. Ergebnisse der RT-PCR- und ELISA-Untersuchung aus Serumproben	46
4.3.2. Sero- und Virusprävalenz.....	48
4.3.3. Speichelproben versus Serumproben	49
5. Diskussion	53
6. Schlussfolgerung	61
7. Zusammenfassung.....	63
8. Summary.....	67
9. Literaturverzeichnis	69
10. Abbildungsverzeichnis	87
11. Tabellenverzeichnis	89
12. Danksagung.....	91
13. Anhang.....	93

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Akk. = Antikörper

BALF = Bronchoalveolare Flüssigkeit

BB = Betriebsbesuch

Bp = Basenpaare

cm = Zentimeter

CP = Cool Pack

Ct = „cycle threshold“

DNA = „desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA = „enzyme-linked immunosorbent assay“

EU = Europäischer

G = Gramm

GKID₅₀ = Gewebekultur-infektiöse Dosis 50 %

Gll. = Glandulae

°C = Grad Celsius

IgA = Immunglobulin A

IgG = Immunglobulin G

IgM = Immunglobulin M

HIV = „human immunodeficiency virus“

IU = Internationale Einheit

x g = Erdbeschleunigung

M = Molar

Abkürzungsverzeichnis

µl = Mikroliter

ml = Milliliter

mM = milimolar

NA = Nordamerikanischer

ORF = open reading frame

PCR = „polymerase chain reaction“ (Polymerase Kettenreaktion)

PP = Polypropylen

PRRSV = „porcine reproductive and respiratory syndrome virus“

qRT-PCR = „quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction“

RNA = „ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)

RT = Raumtemperatur

RT-PCR = „reverse transcriptase-polymerase chain reaction“

SDS = Sodiumdodecylsulfat

Sec = Sekunde

TGD = Tiergesundheitsdienst

1. Einleitung und Rechtfertigung der Studie

1. Einleitung

Das porcine reproduktive und respiratorische Syndrom Virus (PRRSV; Ordnung Nidovirales, Familie Arteriviridae, Genus Arterivirus) ist ein behülltes, einzelsträngiges RNA-Virus (CAVANAGH, 1997). PRRSV ist in den meisten schweineproduzierenden Ländern endemisch und ist verantwortlich für hohe wirtschaftliche Verluste (NEUMANN et al., 2005; HOLTKAMP et al., 2011; ZIMMERMAN et al., 2012).

Für eine PRRSV-Infektion sind alle Altersgruppen empfänglich. Die klinische Symptomatik ist aber variabel und kann von klinisch unauffällig bis verheerend verlaufen. Grundsätzlich werden zwei Verlaufsformen unterschieden, die reproduktive Verlaufsform, bei adulten Tieren, und die respiratorische Verlaufsform, bei jungen Tieren (ZIMMERMAN et al., 2012). Anhand der Anamnese, klinischen Symptomatik und pathomorphologischen und pathohistologischen Untersuchung kann das PRRSV als Verdachtsdiagnose gestellt werden. Hinweise für eine PRRSV-Infektion sind vermehrte Aborte und / oder die Geburt lebensschwacher oder toter Ferkel, sowie eine verminderte Tageszunahme und respiratorische Symptome bei Aufzuchtferkeln und Mastschweinen (PRIETO und CASTRO, 2000; KLINGE et al., 2009; KOINIG, 2010, ZHOU und YANG, 2010; GRAAGE, 2011; ZIMMERMAN et al., 2012). Der Verdacht einer PRRSV-Infektion wird durch den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente und Antikörper bestätigt (ZIMMERMAN et al., 2012). Zurzeit wird in der Routinediagnostik eine PRRSV-Infektion anhand des Nachweises von PRRSV-spezifischen Antikörpern mittels ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) und anhand des Nachweises von Genomfragmenten mittels PCR („polymerase chain reaction“) nachgewiesen (MATHEU et al., 2006; BALKA et al., 2009). Als Probenmaterial eignen sich Blut und Organmaterial (Lungen, Lymphknoten, Milz, Tonsillen) verdächtiger Schweine, wobei die Probengewinnung auf invasiven Entnahmetechniken basiert (DAY et al., 2011; ZIMMERMAN et al., 2012). Die unterschiedliche Sero- und Virusprävalenz in den schweineproduzierenden Betrieben und verschiedenen Altersgruppen, sowie die hohe genetische Variabilität des PRRSV stellt eine große Herausforderung für den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente und Antikörper (ROBERTS, 2003; DUINHOF et al., 2011; TOPLAK et al., 2012). Deswegen wurde im Jahr 2003 in

1. Einleitung und Rechtfertigung der Studie

Österreich das bundesländerübergreifende „Programm zur Überwachung von PRRS in österreichischen Herdebuchzuchtbetrieben“ des Tiergesundheitsdienstes (TGD) initiiert. Das Programm umfasst eine Stichprobengröße von insgesamt 14 Blutproben pro Betrieb. Zusätzlich müssen alle Schweine im Quarantänestall untersucht werden. Die gewonnenen Proben werden mittels ELISA untersucht. Das Untersuchungsintervall beträgt eine 3 malige Beprobung der Schweine eines Betriebes pro Jahr (ANNONYMUS, 2004).

Im Jahr 1997 wurde zum ersten Mal beschrieben, dass PRRSV aus Speichelproben isoliert werden kann (WILLS et al., 1997). Dies lässt den Schluss zu, dass Speichelproben zum PRRSV-Nachweis eingesetzt werden können, um effizient viele Schweine eines Betriebs auf ihren PRRSV-Status überprüfen zu können.

Auf der Suche nach effizienteren Screeningmethoden für Betriebe wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika in jüngster Zeit Methoden zum Nachweis von PRRSV-spezifischen Genomfragmenten und PRRSV-spezifischen Antikörpern in Speichelproben entwickelt. Die Entnahme der Speichelproben mittels Kaustrieken stellt eine nicht invasive, kosten- und zeiteffektive Methode für den PRRSV-Nachweis dar (PRICKETT et al. 2008a; KITTAWORNAT et al., 2012; OLSEN et al., 2013).

Ziel dieser Arbeit war, das PRRSV in Serum- und Speichelproben aus vier Steirischen Betrieben nachzuweisen und anhand der erhobenen Ergebnisse die Prävalenz des Erregers in der Zuchsaunenherde, sowie bei Aufzucht- und Zuchtferkeln zu bestimmen und Speichelproben als alternatives Probenmaterial für den Nachweis einer PRRSV-Infektion zu etablieren.

2. Literaturübersicht

2.1. PRRSV

Das porcine reproduktive und respiratorische Syndrom Virus (PRRSV) wurde in den späten 80er (USA) und frühen 90er (Europa) Jahren zum ersten Mal beschrieben (WENSVOORT et al., 1991; COLLINS et al., 1992). Nach den ersten PRRSV-Ausbrüchen in Deutschland wurden seit 1991 Ausbrüche aus den Niederlanden, Spanien, Frankreich und Großbritannien, sowie 1992 aus Dänemark (WENSVOORT et al., 1991; LINDHAUS und LINDHAUS, 1991; BØTNER et al., 1994) gemeldet. In Österreich wurden die ersten PRRSV-Ausbrüche 1994 berichtet (KRASSINIG et al., 1994). Heute tritt das PRRSV in den meisten Schweineproduzierenden Ländern endemisch auf und ist verantwortlich für hohe wirtschaftliche Verluste. Studien aus den USA zeigten, dass PRRSV Kosten von \$ 560.32 Millionen (2005) bis \$ 668.58 Millionen (2011) pro Jahr verursacht (NEUMANN et al., 2005; HOLTKAMP et al., 2012). Europäische Studien ergaben, dass ein PRRSV-Ausbruch 126 € pro Sau kostet (NIEUWENHUIS et al., 2012).

2.1.1. Ätiologie, genomische Struktur des PRRSV und Pathogenese

PRRSV wird der Ordnung Nidovirales, Familie Arteriviridae, Genus Arterivirus zugeordnet und ist ein einzelstängiges, behülltes RNA-Virus (CAVANAGH, 1997). Das Virus lässt sich in zwei Subtypen einteilen (Abbildung 1), dem europäischen (EU-Typ, Typ 1) und dem nordamerikanischen (NA-Typ, Typ 2) Genotyp (STADEJEK et al., 2002; STADEJEK et al., 2006; ZIMMERMAN et al., 2012). Beide Genotypen sind weltweit verbreitet und verantwortlich für sehr ähnliche Krankheitsbilder, weisen aber antigenetische und genetische Unterschiede auf (MURTAUGH et al., 2010). Neben den beiden Hauptgenotypen gibt es die hochpathogenen (HP) Genotypen, die Osteuropa und Asien vorkommen (KARNIYCHUK et al., 2010; ZHOU und YANG, 2010).

2. Literaturübersicht

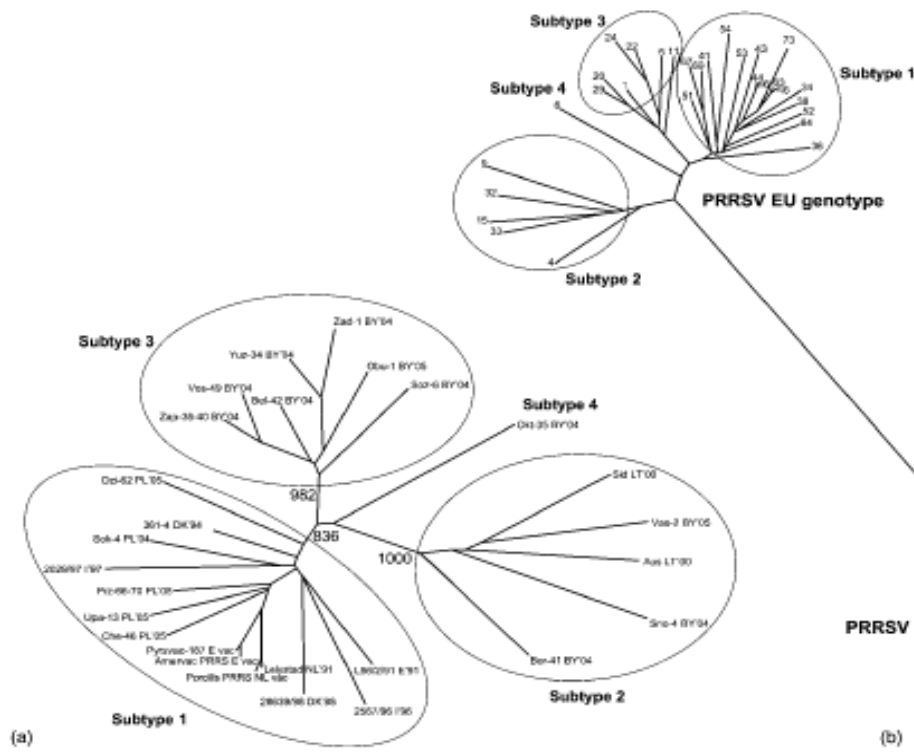


Abbildung 1: (a) Subtypen des EU-Genotyps; (b) PRRSV EU- und US-Genotypen; Einteilung anhand der Differenzierung des ORF (open reading frame) 5. Nach STADEJEK et al. (2006)

Die genomische Organisation des PRRSV ist ähnlich anderer Arteriviren, wie z. B. das Lactatdehydrogenase-elevating Virus und das equine Arterivirus. Das PRRSV besteht aus ca. 15.000 Nukleotiden und neun ORF's („open reading frame“) die für sechs bis sieben Strukturproteine und einige Nichtstrukturproteine codieren (DOKLAND, 2010). Das ORF 1a und 1b produzieren zwei Polypeptide die durch virale Proteasen 14 Nicht-Strukturproteine bilden (ZIEBUHR et al., 2000; ZIMMERMAN et al., 2012). Die ORF's 2-7 codieren für die Membranproteine GP2-5, das M- und N-Protein (DEA et al., 2000; ZIMMERMAN et al., 2012).

Das PRRSV besitzt einen starken Tropismus zu porzinen Makrophagen (CALVERT et al., 2007). Für die Infektion der Zielzellen benötigt das PRRSV vor allem drei Rezeptoren, das CD163, den Sialoadhesin-Rezeptor und den Heparansulfat-Rezeptor (Abbildung 2). Die Sialoadhesin- und Heparansulfat-Rezeptoren werden für die Bindung des PRRSV an der Zelloberfläche benötigt und CD163 für das uncoating und die Freisetzung der viralen RNA (CALVERT et al., 2007; DOKLAND, 2010; YOO et al., 2012). Nachdem genügend Viruspartikel repliziert worden sind, werden die

2. Literaturübersicht

befallenen Alveolarmakrophagen apoptotisch und die virale RNA wird freigesetzt (COSTERS et al., 2008; DOKLAND, 2010).

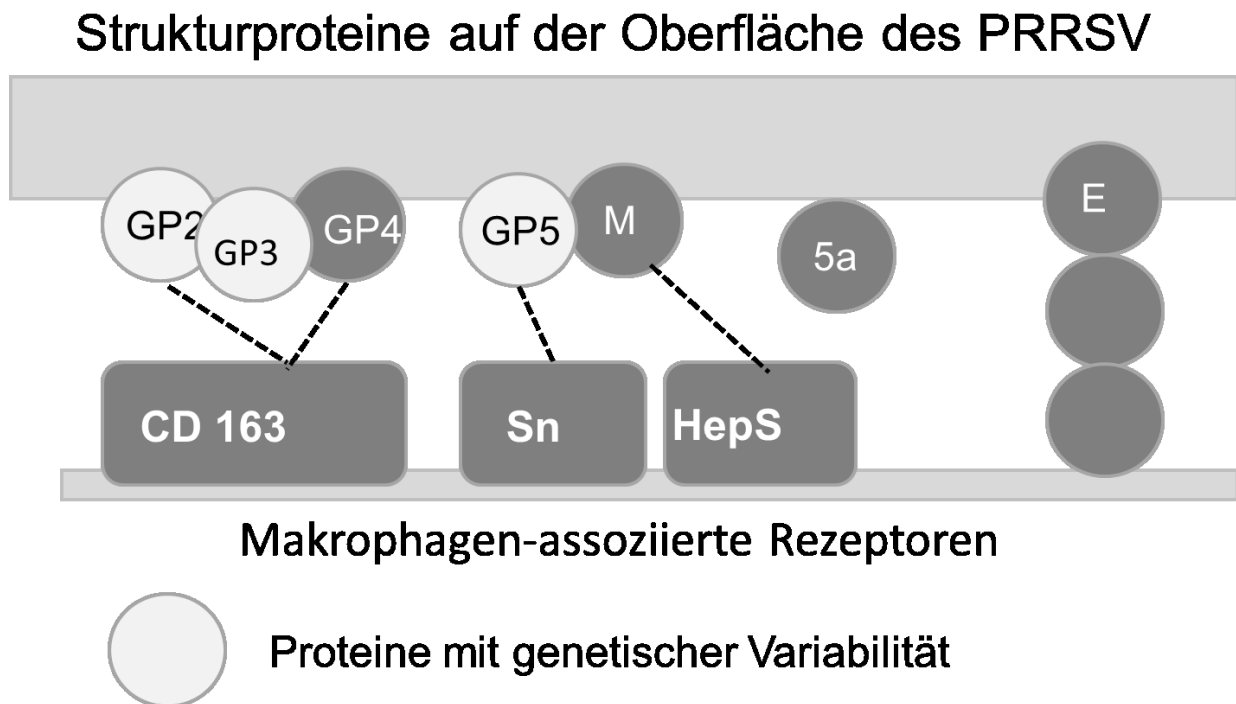


Abbildung 2: Interaktion zwischen PRRSV und Makrophagen; beteiligte Strukturproteine des PRRSV und Makrophagen assoziierte Rezeptoren die für die Virus-Zellen-Interaktion benötigt werden; Sn: Sialoadhesin-Rezeptor; HepS: Heparansulfat

2.1.2. Übertragung des PRRSV

Das PRRSV kann sowohl horizontal als auch vertikal übertragen werden. Die horizontale Übertragung erfolgt über Speichel, Milch, Samen, Nasensekret und Urin (Tabelle 1). Neben dem direkten Kontakt, spielt die indirekte Übertragung des PRRSV eine wichtige Rolle. Als indirekte Vektoren können der Mensch, eine iatrogene Übertragung, sowie Arbeitsmaterial und Kleidung dienen (PITKIN et al., 2009a; THOMPSON et al., 2012). PRRSV kann über Insekten (*Musca domestica*) oder über den Wind übertragen werden (PITKIN et al., 2009b; OTAKE et al., 2010). Die Übertragung zwischen den Herden erfolgt vor allem über den Tierverkehr (DEE et al., 2006).

2. Literaturübersicht

Tabelle 1: Übertragung des PRRSV und Dauer der Ausscheidung

Medium	Ausscheidungsdauer	Literatur
Speichel	42 Tage	(WILLS et al., 1997)
Nasensekret	21 Tage	(CHRISTIANSON et al., 1993)
Urin	28 Tage	(WILLS et al., 1997)
Samen	92 Tage	(CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995)
Kot	> 35 Tage	(CHRISTIANSON et al., 1993)
Milch	Laktation	(KANG et al., 2010)
Tonsille	165 Tage	(FANGMAN et al., 2007)

Die vertikale Übertragung auf die Feten erfolgt über die Plazenta. Die Infektion der Feten kann ab dem 14. Trächtigkeitstag erfolgen. Eine effiziente Überschreitung der Plazenta ist bei den meisten PRRSV-Stämmen erst im letzten Trimester möglich (ROWLAND, 2010). Das Fehlen von Sialoadhesin bei Makrophagen der fetalen Plazenta bis Tag 50-60 der Trächtigkeit ist möglicherweise die Ursache dafür, dass PRRSV bis zu diesem Zeitpunkt nicht transplazentar übertragen werden kann (KARNIYCHUK und NAUWYNCK, 2009).

2.1.3. Klinische Symptome und pathologische Veränderungen einer PRRSV-Infektion

Grundsätzlich sind alle Altersgruppen für eine PRRSV-Infektion empfänglich. Die klinische Symptomatik ist aber sehr variabel und kann von klinisch unauffällig bis verheerend verlaufen (ZIMMERMAN et al., 2012). Es werden vor allem zwei Verlaufsformen einer PRRSV-Infektion unterschieden:

- a) Reproduktive Verlaufsform bei adulten Tieren
- b) Respiratorische Verlaufsform bei Aufzucht- und Mastschweinen

Die klinischen Symptome werden durch die Virulenz des Virusstammes, Immunstatus des Schweines, sowie durch mögliche Sekundärinfektionen und

2. Literaturübersicht

Management des Betriebes beeinflusst (PITKIN et al., 2009a; KARNIYCHUK et al., 2010; ZHOU und YANG, 2010; LINHARES et al., 2012). Sekundärinfektionen mit *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* und *Mycoplasma hyopneumoniae* können die Symptomatik der respiratorischen Form verschlimmern (CHOI et al., 2003; ZIMMERMAN et al., 2012). Zusätzlich kann PRRSV als Sekundärerreger zu einer Pathogenitätssteigerung anderer Erkrankungen führen. So können durch eine PRRSV-Infektion die klinischen Symptome des „Postweaning multisystemic wasting syndrome“ (PMWS) deutlich aggraviert werden (ROVIRA et al., 2007). Ein weiter wichtiger Faktor für die Ausprägung der klinischen Symptomatik einer PRRSV-Infektion ist die natürliche Resistenz des Wirts gegenüber PRRSV (LUNNEY und CHEN, 2010).

a) Respiratorische Form

Die respiratorische Form tritt vor allem bei Absetz-, Aufzucht- und Mastschweinen auf. Die respiratorische Form ist gekennzeichnet durch eine erhöhte rektale Körpertemperatur, Anorexie und Lethargie. Die Schweine zeigen Dyspnoe, Husten, Nasenausfluss, Konjunktivitis, kutane Hyperämie und Zyanosen an den Extremitäten und Ohren (KOINIG, 2010; ZHOU und YANG, 2010; GRAAGE, 2011; ZIMMERMAN et al., 2012). Dadurch kommt es nach einer PRRSV-Infektion zu einer signifikanten Abnahme der Tageszunahmen (KLINGE et al., 2009; BADAoui et al., 2013). Bei Ferkeln findet schon am ersten Tag nach der Infektion eine Virämie statt, die am dritten Tag post infectionem (p. i.) ihren Höhepunkt erreicht. Nach 14 Tagen sinkt die virämische Phase, bis nach etwa 35 Tagen kein Virus mehr im Blut nachweisbar ist (KLINGE et al., 2009).

Die pathomorphologischen Symptome sind gekennzeichnet durch eine interstitielle Pneumonie, die von bräunlich marmorierter Farbe sind. Die betroffenen Areale sind von etwas prallerer Konsistenz, nicht kollabiert, sowie elastisch bis gummiartig (YAEGER, 2002; OKUDA et al., 2008; KOINIG, 2010; GRAAGE, 2011). Histologisch dominiert das Bild einer interstitiellen Pneumonie. Es kommt durch Hypertrophie und Hyperplasie der Pneumozyten vom Typ 2, sowie einer Infiltration von Makrophagen zu einer Verbreiterung der Alveolarsepten (OPRIESSNIG et al., 2008; OKUDA et al., 2008; KOINIG, 2010).

2. Literaturübersicht

b) Reproduktive Form

Bei adulten Schweinen hängt die Ausprägung der PRRSV-assoziierten Symptome vor allem vom Reproduktionszyklus der Sauen ab. Die Reproduktionsstörungen beruhen auf degenerativen Veränderungen mit Epithelablösung an den fetalen Nidationsstellen der Plazenta und der daraus resultierende Separation der fetoplazentaren Einheit mit nekrotisierender Arteriitis (KARNIYCHUK et al., 2011). Daraus resultiert eine fetale Hypoxie. Die Symptome einer PRRSV-Infektion bei Zuchtsauen sind Aborte, Totgeburten oder die Geburt lebensschwacher Ferkel (PRIETO und CASTRO, 2000; ROWLAND, 2010).

2.1.4. PRRSV-Diagnostik

Der Verdacht einer PRRSV-Infektion wird anhand von Anamnese, klinischer Symptomatik und pathomorphologischer und pathohistologischer Untersuchung gestellt. Dieser Verdacht kann durch einen Virusnachweis oder durch das Vorhandensein PRRSV-spezifischer Antikörper bestätigt werden. In der Routinediagnostik haben sich die RT-PCR („reverse transcriptase polymerase chain reaction“) und die ELISA-Methode („enzyme linked immunosorbant assay“) zum Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente und Antikörper etabliert (ZIMMERMAN et al., 2012). Als Probenmaterial eignet sich Organmaterial (Lungen, Lymphknoten, Milz, Tonsillen) verdächtiger oder infizierter Schweine. Des Weiteren können Serumproben, Tonsillargeschabsel, bronchoalveoläre Flüssigkeit (BALF), Samen, Abortmaterial, Organe totgeborener Ferkel, sowie Serumproben lebensschwacher Ferkel untersucht werden (REVILLA-FERNÁNDEZ et al., 2005; PALZER et al., 2008; NATHUES et al., 2009; ROWLAND, 2010; NATHUES et al., 2011a; DAY et al., 2011; ZIMMERMAN et al., 2012).

Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper

Der Nachweis von Antikörpern ist die am häufigsten angewandte Methode in der Routinediagnostik für den Nachweis einer PRRSV-Infektion. Serologische Verfahren können am lebenden Tier den Verlauf einer PRRSV-Infektion dokumentieren. Für

2. Literaturübersicht

den Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung:

- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ALBINA et al., 1992)
- Indirect Fluorescent Antibody Test (YOON et al., 1992)
- Immunoperoxidase Monolayer Assay (WENSVOORT et al., 1991)
- Serumneutralisationstest (YOON et al., 1994)

In der Routinediagnostik werden für den Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper hauptsächlich ELISA-Verfahren genutzt (MATEU et al., 2006). Als Goldstandard für den serologischen Nachweis des PRRSV hat sich der kommerziell erhältliche HerdChek[®] X3 PRRS ELISA (IDEXX Laboratories GmbH, Ludwigsburg, Deutschland) etabliert (ZIMMERMAN et al., 2012). Dieses Verfahren besitzt eine Sensitivität von 98,8 % und eine Spezifität von 99,9 %. PRRSV-spezifische Antikörper können zwischen 9 Tage p.i. bis zu 12 Monate (4-12 Monate) nachgewiesen werden (ROBERTS and ALMOND, 2003).

Nachweis des PRRSV und PRRSV-spezifischer Genomfragmente

Für den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung:

- In situ Hybridisierung (LAROCHELLE et al., 1996)
- RT-PCR (OLEKSIEWICZ et al., 1998; REVILLA-FERNÁNDEZ et al., 2005; BALKA et al., 2008) und Real-time RT-PCR (EGLI et al., 2001; BALKA et al., 2009)

Der Nachweis des PRRSV erfolgt mittels:

- Virusisolation (WENSVOORT et al., 1991; BAUTISTA et al., 1993)
- Immunhistochemie (MAGAR et al., 1993; HALBUR et al., 1994)
- Fluorescent Antibody (LANGENHORST et al., 2012)

2. Literaturübersicht

In der Routinediagnostik haben sich kommerziell erhältliche und in house RT-PCR-Verfahren etabliert. Es stehen konventionelle oder quantitative Verfahren zur Verfügung (OLEKSIWICZ et al., 1998; EGLI et al., 2001; BALKA et al., 2008; BALKA et al., 2009). Aufgrund der hohen genetischen Variabilität des PRRSV ist der Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente frustrierend und Proben können falsch negativ bewertet werden. Eine Studie von TOPLAK et al. (2012) zeigt, dass bei fünf verschiedenen PCR-Verfahren die Sensitivität zwischen 96,3-53,8 % schwankt (TOPLAK et al., 2012). Ein durchgeführter Ringversuch für den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente zeigte, dass im Mittel 20,6 % (0-43,3 %) der Proben falsch negativ waren (TRUYEN et al., 2006). Als Gründe für die falsch negativen Befunde diskutierten TRUYEN et al. (2006) inhibierende Faktoren, die die Reaktion stören, die genetische Variabilität des PRRSV und die daraus resultierende fehlende Übereinstimmung der Primerpaare.

2.1.5. Überwachungsprogramme PRRSV

Es steht keine spezifische Therapie gegen das PRRSV zur Verfügung; deswegen ist es wichtig das Risiko des PRRSV-Eintrages in einem negativen Betrieb zu vermeiden. Als Risikoquellen gelten der Eintrag des PRRSV über die Luft, Tiertransporte, sowie durch PRRSV-positiven Samen und Schweine und andere direkte und indirekte Vektoren (DEE et al., 2006; CORZO et al., 2010; DEE et al., 2012). Für eine effektive Überwachung des PRRSV-Staus einer Herde sind folgende Faktoren von besonderer Wichtigkeit:

- I. Die erwartete Prävalenz des PRRSV in einer Herde (DUINHOF et al., 2011)
- II. Die Wahl der Stichprobengröße (CANNON and ROE, 1982)
- III. Das richtige Probenmaterial (ZIMMERMAN et al., 2012)
- IV. Das verwendete Nachweisverfahren; unter Berücksichtigung der Sensitivität und Spezifität (DUINHOF et al., 2011; ZIMMERMAN et al., 2012)
- V. Frequenz der Untersuchung (CORZO et al., 2010)
- VI. Die untersuchte Altersgruppe (DUINHOF et al., 2011)

2. Literaturübersicht

Im Jahr 2001 wurde ein bundesländerübergreifendes Überwachungsprogramm für österreichische Herdebuchzuchtbetriebe eingeführt. Dabei wurden je 9 Tiere pro Betrieb serologisch auf klinisch relevante Erreger untersucht. Dieses Überwachungsprogramm zeigte, dass das PRRSV einen großen Einfluss auf den Gesundheitsstatus und die Wirtschaftlichkeit der Betriebe hat (ANNONYMUS, 2004). Als Konsequenz wurde im Jahr 2003 das TGD-Programm „Programm zur Überwachung von PRRS in österreichischen Herdebuchzuchtbetrieben“ gestartet. Das Programm umfasst eine Stichprobengröße von insgesamt 14 Blutproben pro Betrieb (vier Alt- und vier Jungsauen, vier Läufer zwischen 30 und 45 kg und zwei Eber). Zusätzlich müssen alle Schweine im Quarantänestall untersucht werden. Die gewonnenen Proben werden mittels ELISA-Verfahren untersucht. Die Schweine eines Betriebes werden in einem viermonatigem Untersuchungsintervall beprobt (ANNONYMUS, 2004).

2.2. Speichelproben

2.2.1. Speichel des Schweines

Das Schwein produziert 1-1,5 L Speichel pro Tag (BREVES, 2010). Die Produktion des Speichels ist temperatur- und altersabhängig. So wird bei höheren Umgebungstemperaturen mehr Speichel produziert (GEORGIEV, 1972). Der in der Maulhöhle sezernierte Speichel setzt sich aus serösen, mucösen oder seromucösen Sekreten der verschiedenen Speicheldrüsen zusammen (Abbildung 3). Das Schwein besitzt neben der paarig angelegten Glandulae (Gll.) parotis und Gll. mandibularis, die 90 % des Speichels produzieren, die Gll. Buccales dorsales und ventrales, die Gll. Sublingualis monostomatica und polystomatica (SISSON, 1975; BREVES, 2010; KOENIG et al., 2012).

2. Literaturübersicht

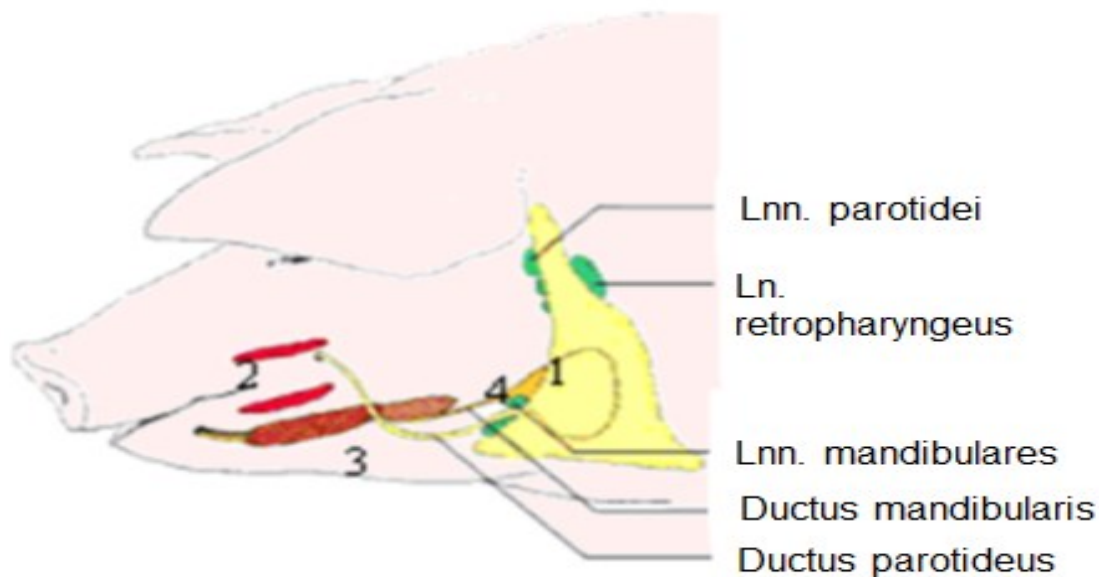


Abbildung 3: Ohrspeicheldrüsen beim Schwein: 1: *Glandula (Gl.) parotis*; 2: *Glandulae (Gll.) buccales dorsales u. ventrales*; 3: *Gll. sublingualis monostomatica u. polystomatica*; 4: *Gl. mandibularis*. Nach KÖNIG et al. (2012).

Die Zusammensetzung des sezernierten Speichels besteht vor allem aus Wasser. Aber der Speichel enthält auch gelöste biologisch aktive Moleküle, wie z. B. Muzin, Amylase, Lipase und Glykoproteine (PUY, 2006). Stoffwechselmetaboliten, die im Serum nachgewiesen werden können, sind auch im Speichel in geringerer Konzentration detektierbar (KAUFMAN und LAMSTER, 2002). Der Austausch zwischen Serumbestandteilen und Speichel geschieht über intrazelluläre und extrazelluläre Mechanismen. Die Bestandteile werden passiv, per Diffusion, oder aktiv über die Kapillarwände in die Acinus- oder Ductuszellen aufgenommen und in den Speichel sezerniert. Sie können auch durch Ultrafiltration extrazellulär in den Speichel gelangen (DROBITCH und SVENSSON, 1992; HAECKEL und HANECKE, 1993; JUSKO und MILSAP, 1993).

In der Maulhöhle wird der durch die Speicheldrüsen sezernierte Speichel mit Sekreten der Gingiva, Blut und Serum aus oralen Wunden, Sputum aus dem Respirationstrakt, desquamierter Mucosalzellen der Schleimhaut, Nahrungsresten und Wasser, sowie Bakterien und Bakterienprodukte, Viren und Pilzen durchmischt

2. Literaturübersicht

(Abbildung 4). Das entstandene Produkt wird als Mundhöhlenflüssigkeit bezeichnet (KAUFMAN und LAMSTER, 2002).

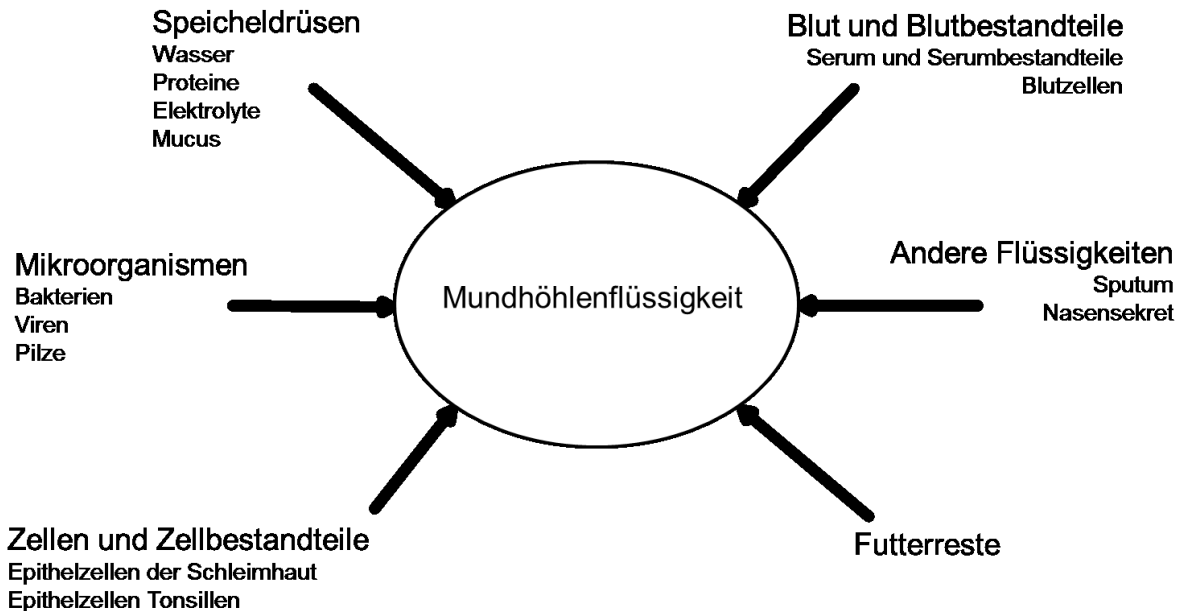


Abbildung 4: Zusammensetzung des Speichels. Nach KAUFMAN und LAMBSTER (2002)

Die Aufgaben des Speichels sind vielfältig, wobei die primären Aufgaben eine unterstützende Funktion bei der Nahrungsverdauung und dem Transport des Futterbissens haben (PUY, 2006; BREVES, 2010). Der Speichel ist beteiligt bei der lokalen Abwehr gegen Infektionskrankheiten und hat eine wichtige Funktion bei der Thermoregulation (GEORGIEV, 1972; KAUFMAN und LAMSTER, 2002).

2.2.2. Geschichte der Speichelproben

Seit dem frühen 20. Jahrhundert ist bekannt, dass sowohl Serummetaboliten, als auch Infektionserreger im Speichel nachgewiesen werden können (POLLACI und CERAULO, 1909; MICHAELIS, 1901).

POLLACI und CERAULO (1909) zeigten, dass bei Patienten die an Maltafieber erkrankt waren, Antikörper gegen *Brucella (B.) melitensis* im Speichel nachzuweisen waren. COELMAN und APPELMAN (1953) konnten eine Korrelation zwischen Serumantikörpern und Antikörpern im Speichel gegen *Treponema pallidum*

2. Literaturübersicht

subspecies pallidum nachweisen. Seither werden in der Humanmedizin Speichelproben zum Nachweis von Infektionserregern (Tabelle 2), Hormonen und Drogen genutzt (KAUFMAN und LAMSTER, 2002; STRECKFUS und BIGLER, 2002; PRICKETT und ZIMMERMAN, 2010). Ein Vorteil der Speichelproben ist, dass dieses Verfahren nichtinvasiv ist und die Patienten den Speichel selber entnehmen können. (CHIAPPIN et al., 2007).

In der Veterinärmedizin wird der Nachweis von Antikörpern und Mikroorganismen in Speichelproben von domestizierten Säugetieren, ähnlich wie in der Humanmedizin beschrieben. Die ersten Speichelproben bei Säugetieren wurden im Jahr 1905 bei Pferden in Russland entnommen (BLAKE und TOBIN, 1986). Bei der Katze kann beispielsweise das feline Immunodefizienz Virus (FIV) und das feline Leukämie Virus (FeLV) im Speichel nachgewiesen werden (YAMAMOTO et al., 1988; POLI et al., 1992; GOMES-KELLER et al., 2006). Beim Hund kann unter anderem das Tollwutvirus und *Bartonella spp.* im Speichel nachgewiesen werden (KASEMPIMOLPORN et al., 2000; DUNCAN et al., 2007). Neben dem Nachweis von bakteriellen Infektionserregern, wie z. B. *Escherichia coli* und Salmonellen, liegt der Schwerpunkt der Speicheldiagnostik beim Rind auf dem Nachweis des Maul- und Klauenseuchenvirus (SMITH et al., 2004; SMITH et al., 2005; MORIOKA et al., 2009).

2. Literaturübersicht

Tabelle 2: Übersicht humaner Krankheitserreger, die im Speichel indirekt oder direkt nachgewiesen werden können. Nach PRICKETT und ZIMMERMAN (2011).

Erreger	Nachweis von:
<i>Bordetella pertussis</i>	IgG
Coronavirus	Virus (PCR)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	IgG
Cytomegalovirus	IgG, IgA
Denguevirus	IgG, IgM
Diphtherie Toxoid	IgG, IgA
Ebolavirus	IgG, PCR
Epstein-barvirus	IgG, IgA
Hantaanvirus	IgG, IgM
<i>Helicobacter pylori</i>	IgG
Hepatitis A, B and C	IgM
Humanes Herpes Virus type 1	Virus (PCR)
Humanes Herpes Virus type 6	Virus (PCR)
Humane Leptospirose	IgM
Influenzavirus	IgA
Japanese encephalitis	IgG, IgM, IgA
Masern	IgM
Mumps	Neutralisierende Akk., IgM
Norwalkvirus	IgG, IgA
Poliovirus	IgA
Rotavirus	IgA
Rubella	IgG
<i>Salmonella typhi</i>	IgA
<i>Treponema pallidum</i>	IgG
<i>Trypanosoma cruzi</i>	IgG
Varicella-zoster virus	Virus (PCR)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	IgG

2.2.3. Speichelproben beim Schwein

Die Entnahme von Speichelproben beim Schwein ist eine zeit- und kosteneffektive, sowie nicht invasive Methode für den Nachweis von Infektionserregern (PRICKETT et al., 2008a; RAMIREZ et al., 2012). Die Probenentnahme gestaltet sich einfach. Für die Gewinnung der Speichelproben sollte ein gut flüssigkeitsabsorbierendes Material genutzt werden (OLSEN et al., 2013). Aufgrund der guten Absorption eignet sich für die Speichelprobenentnahme unbehandelte Baumwolle (OLSEN et al., 2012).

2. Literaturübersicht

Schweine bevorzugen ein flexibles und kaubares Material (FEDDES und FRASER, 1994). Sie sind neugierige Tiere und untersuchen neue Gegenstände durch Benagen des Materials, wobei dieses mit Speichel angefeuchtet wird (KITTAWORN RAT und ZIMMERMAN, 2011). Die Kaustricke werden an die Buchtenwand angebracht und den Schweinen für 20 bis 45 Minuten präsentiert, um eine adäquate Anzahl an Schweinen zu untersuchen (HITE et al., 2012; SEDDON et al., 2012). Die Effizienz der Speichelproben für den Nachweis von Infektionserkrankungen beim Schwein ist abhängig von den eingesetzten Nachweismethoden. Aufgrund der Zusammensetzung des Speichels müssen die in der Routinediagnostik eingesetzten Nachweisverfahren (PCR, ELISA) an dieses Testverfahren adaptiert werden (CHITTICK et al., 2011; SCHMOLL et al., 2012; KITTAWORN RTA et al., 2012).

Der erste Nachweis von Infektionserkrankungen im Speichel beim Schwein wurde 1976 veröffentlicht. Die Studie zeigte, dass nach einer intranasalen Vakzination gegen das klassische Schweinepestvirus Antikörper im Speichel von Schweinen nachgewiesen werden konnten (CORTHIER, 1976).

In den letzten fünf Jahren haben verschiedene Forschungsgruppen diagnostische Testverfahren (direkte und indirekte) zum Nachweis viraler und bakterieller Erreger im Speichel entwickelt (PRICKETT et al., 2008a; PRICKETT et al., 2008b; COSTA et al., 2012; ROMAGOSA et al., 2012; PANYASING et al., 2012; RAMIREZ et al., 2012; OLSEN et al., 2013; KITTAWORN RAT et al., 2013).

- PRRSV (PRICKETT et al., 2008a; PRICKETT et al. 2008b; CHITTICK et al., 2011; KITTAWORN RAT et al., 2013)
- Porzines Circovirus Typ 2 (PCV) 2 (2008b; PRICKETT et al., 2011; RAMIREZ et al., 2012)
- Influenza A Virus (DETMER et al., 2011; PANYASING et al., 2012; ROMAGOSA et al., 2012; RAMIREZ et al., 2012)
- TTV (Torque teno virus) 1 und 2 (RAMIREZ et al., 2012)
- Afrikanisches Schweinepestvirus (MUR et al., 2013)
- *Actinobacillus pleuropneumoniae* (COSTA et al., 2012)
- *Erysipelothrix rhusiopathiae* (GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2012)

2. Literaturübersicht

Neben dem Nachweis von Infektionserregern können Speichelproben auch zum Nachweis für Marker systemischer Krankheiten und Stress genutzt werden (DE JONG et al., 2000; SAMYN et al., 2002; GUTIÉRREZ et al., 2011; GUTIERREZ et al., 2012a; KITTAWORNARAT et al., 2012; GUTIÉRREZ et al., 2012b; GUTIÉRREZ et al., 2012c).

2.2.4. Speichelproben zum Nachweis des PRRSV

Im Jahr 1997 wurde zum ersten Mal beschrieben, dass PRRSV aus Speichelproben isoliert werden kann (WILLS et al., 1997). Dies lässt den Schluss zu, dass Speichelproben zum PRRSV-Nachweis eingesetzt werden können, um effizient viele Betriebe auf ihren PRRSV-Status überprüfen zu können.

Seit 2008 werden in den USA der Nachweis des PRRSV aus Speichelproben etabliert (PRICKETT et al., 2008a; PRICKETT et al., 2008b). PRICKETT et al. (2010) zeigten, dass das PRRSV-spezifische Genomfragmente und Antikörper über 288 Stunden im Speichel nachweisbar sind. In experimentellen Versuchen und Felduntersuchungen wurde der Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente erbracht, wobei manche Studien über einen mittelmäßigen Erfolg referierten, während andere Ergebnisse vergleichbar mit den Serumproben waren (PRICKETT et al., 2008a; PRICKETT et al., 2008b; RAMIREZ et al., 2012; OLSEN et al., 2013). In Europa wird diese Art der Probenentnahme bislang selten verwendet. Ein Grund ist die fehlende Anpassung der Testverfahren an das Medium Speichel (SCHMOLL et al., 2012; SATTLER et al., 2013).

3. Material und Methode

3.1. Studienaufbau

In der vorliegenden Studie wurde der Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente und Antikörper in Serum- und Speichelproben untersucht. Für die Adaptation des molekuarbiologischen Nachweises (RT-PCR) PRRSV-spezifischer Genomfragmente aus dem Speichel der Schweine wurde PRRSV-negativer Speichel gewonnen und diesem Virus zugesetzt. Der Einfluss von Lagerungszeit und -temperatur, sowie die Behandlung des Speichels mit Zusätzen wurden überprüft. Anschließend wurden in vier steirischen Betrieben Serum- und Speichelproben entnommen und auf das Vorhandensein von PRRSV-spezifischen Antikörpern und Genomfragmenten überprüft. Vorberichtlich waren zwei der ausgewählten Betriebe PRRSV positiv, ein Betrieb war PRRSV negativ und der vierte Betrieb hatte einen unbekannten PRRSV-Status. In der Ferkelaufzucht wurde die Stichprobengröße einer geschätzten Prävalenz von 10 % angepasst und Blutproben bei der entsprechenden Anzahl an Tieren entnommen (CANON und ROE, 1982; Tabelle 3). Zusätzlich wurde pro Ferkelgruppe (Bucht) eine Speichelprobe entnommen. In der Sauenherde wurden von den Sauen Blutproben entnommen.

Tabelle 3: Berechnung der Stichprobengröße um ein oder mehr positive Proben in einer infizierten Population zu detektieren; Irrtumswahrscheinlichkeit von 95 % Wahrscheinlichkeit (CANON u. ROE, 1982).

Populationsgröße	Prävalenz in %				
	30	25	20	15	10
20	7	9	10	12	16
30	8	9	11	14	19
40	8	10	12	15	21
50	8	10	12	16	22
60	8	10	12	16	23
70	8	10	13	17	24
80	8	10	13	17	24
90	8	10	13	17	25
100	9	10	13	17	25
150	9	11	13	18	27
200	9	11	13	18	27
500	9	11	14	19	28

3. Material und Methode

Die gewonnenen Proben wurden mittels RT-PCR und ELISA auf das Vorhandensein viraler RNA bzw. PRRSV-spezifischer Antikörper untersucht. In der späteren Auswertung der Ergebnisse wurde das Vorhandensein viraler RNA, sowie PRRSV-spezifischer Genomfragmente in zwei verschiedenen Altersgruppen (Zuchtsauen / Aufzucht- und Zuchtferkel) statistisch ausgewertet. Die Speichel- und Serumproben wurden buchtenweise auf statistische Gemeinsamkeit überprüft. Die Sero- und Virusprävalenz wurde berechnet und eine minimale Stichprobengröße wurde ermittelt.

3.2. Effekt der Lagerungszeit und -temperatur auf den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente

Für den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente aus Speichelproben zu unterschiedlichen Lagerungszeiten und bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen wurden insgesamt 30 ml Speichel von serologisch und molekularbiologisch PRRSV-negativen getesteten Schweinen mittels Kaustick gewonnen (siehe 3.4.1.). Es wurden zwei unbehandelte Baumwollstricke (TEGO Oral Fluids Kit, ITL Animal Healthcare, Melbourne, Australien [TEGO] und ein Baumwollstrick [BB], Sankt Josef Werkstatt, Dorfen, Deutschland) miteinander verglichen. Nach der Gewinnung der Speichelproben wurde ein attenuiertes PRRSV-Isolat Typ 1 (Porcilis® PRRS, MSD Animal Health, Boxmeer, Niederlande) der Probe zugegeben. Um den Effekt der Behandlung des Speichels zu untersuchen, wurde der Speichel jedes Entnahmesystems (TEGO, BB) in sechs Behandlungsgruppen, einer unbehandelten Kontrollgruppe und in eine Negativkontrolle aufgeteilt. Drei Teilproben wurden mit 10 mM EDTA und 1 % SDS, 0,01 % Chlorhexidine oder 1 IU Proteinase K behandelt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagert. In einem weiteren Ansatz wurden drei unbehandelte Teilproben nach der Entnahme mittels Sterilfilter, Scheren oder durch eine höhere Zentrifugation ($20.000 \times g$ für 10 Minuten) bearbeitet. Die behandelten Proben wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die unbehandelten Proben wurden für zwei Stunden mittels Cool Pack gekühlt gelagert. Für die Beurteilung des Effekts der Behandlung des Speichels auf den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente wurden für jede Behandlungsgruppe Speichel in Stunde null und zwei untersucht. Teilproben des unbehandelten Speichels wurden nach der zweistündigen Lagerung mittels Cool Pack für 72 Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

3. Material und Methode

oder 10 °C gelagert. Nach 12, 24, 48 und 72 Lagerstunden wurden zwei Ansätze (140 µl je Ansatz) entnommen und bei -80 °C bis zur weiteren molekularbiologischen Untersuchung gelagert. Im Anschluss wurde die virale RNA der Teilproben mittels QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) extrahiert und mittels qRT-PCR („quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction“; Taqman NA und EU PRRSV Reagents, Applied Biosystems, Forster City, USA) auf PRRSV-spezifische Genomfragmente überprüft.

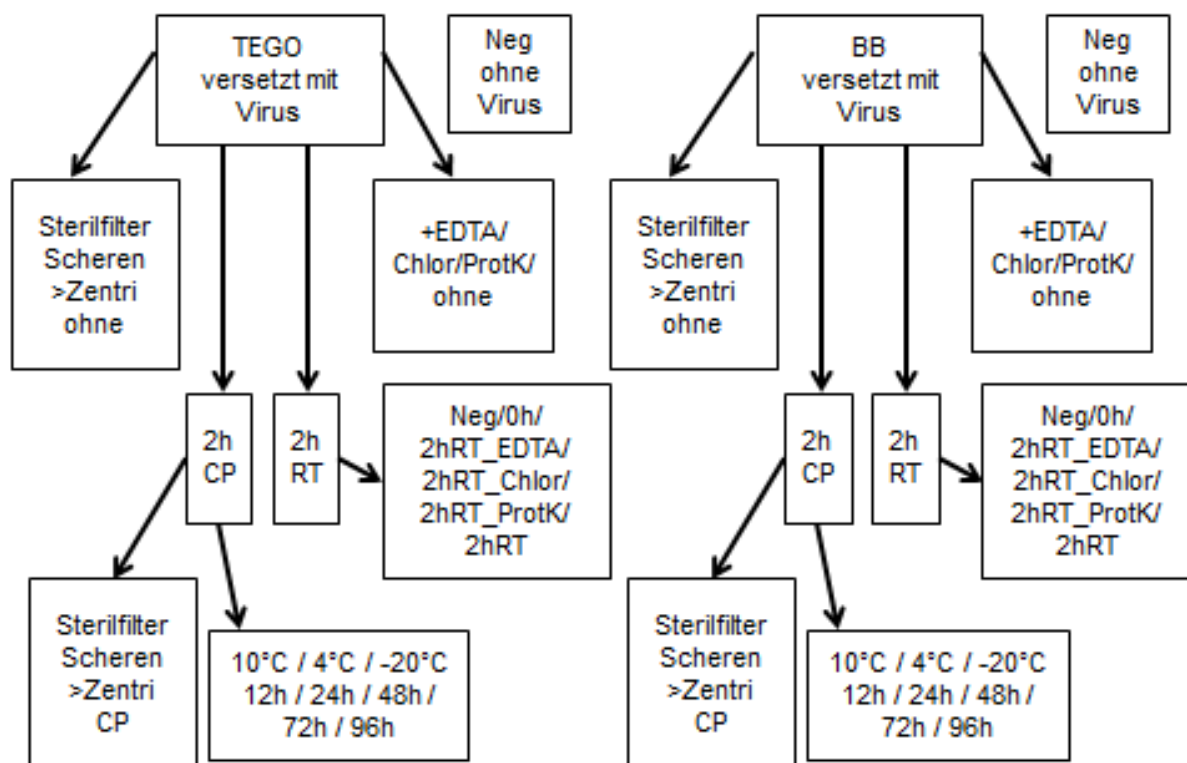


Abbildung 5: Studienaufbau: Effekt der Lagerungszeit und -temperatur auf den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente. BB: Baumwollstrick (Sankt Josef Werkstatt); CP: Cool Pack; RT: Raumtemperatur; neg: negativer Speichel; Chlor: Chohexidine; ProtK: Proteinase K; > Zentri: höhere Zentrifugation (20.000 × g für 10 Minuten)

3.2.1. PRRSV Typ 1

Insgesamt wurden 1,470 ml eines PRRSV Typ 1 Isolat ($2,49 \times 10^7$ Viruskopien pro ml), Stamm DV 4,0 verwendet (MSD Animal Health, Boxmeer, Niederlande).

3. Material und Methode

3.2.2. Herstellung der Reagenzlösungen

10 mM EDTA + 1 % SDS + Speichel	15 µl 20 % SDS
	30 µl 0,11 M EDTA
	225 µl Speichel
Totalvolumen	270 µl Gesamtvolumen
Chlorhexidin 0,01 %	30 µl 0,1 % Chlorhexidin
	240 µl Speichel
Totalvolumen	270 µl Gesamtvolumen
Proteinase K 20 mg / ml	10 µl Proteinase K (0,2 g / ml)
	260 µl Speichel
	270 µl Gesamtvolumen

3.3. Studienbetriebe

Der Versuch wurde in vier steirischen schweineproduzierenden Betrieben durchgeführt. Es wurden zwei PRRSV-positive Betriebe (B1 und B4), ein PRRSV-negativer Betrieb (B2), sowie ein Betrieb mit unbekannten PRRSV-Status (B3) für die Studie ausgewählt (Tabelle 4). Die Betriebe eins bis drei produzierten in einem 3-Wochen-Rhythmus. Der vierte Betrieb produzierte in einem 4-Wochen-Rhythmus. Die Auswahl der Betriebe wurde durch die betreuenden Tierärzte, sowie vom Steirischen Tiergesundheitsdienst anhand von vorangegangenen blutserologischen Untersuchungen getroffen.

3. Material und Methode

Tabelle 4: Übersicht über die Studienbetriebe 1-4 und die Anzahl der am Betrieb gehaltenen Zuchtsauen. Auswahlkriterien waren die Betriebsgröße und der PRRSV-Status der Betriebe.

Betrieb	PRRSV Status	Anzahl Sauen
1 (B1)	positiv	140
2 (B2)	negativ	81
3 (B3)	fraglich	117
4 (B4)	positiv	95

3.4. Probenmaterial

Diese Studie wurde im Rahmen der Überwachung des PRRSV-Staus steirischer Herdebuchzuchtbetriebe durchgeführt. Es wurden insgesamt 539 Blutproben und 58 Speichelproben gewonnen und auf das Vorhandensein PRRSV-spezifischer Antikörper und Genomfragmente mittels ELISA und PCR untersucht (Tabelle 5).

Tabelle 5: Anzahl der Blut- und Speichelproben, betriebsweise dargestellt

Betrieb	Blutproben Sauen	Blutproben Ferkel inkl. Jungsauen und - eber	Speichelproben
B1	45	35	12
B2	81	99	19
B3	117	52	18
B4	95	15	9
Proben insgesamt	338	201	58
539			

3.4.1. Gewinnung der Speichelproben

Für die Entnahme von Speichelproben hat sich ein Kaustick aus unbehandelter Baumwolle bewährt (PRICKETT et al., 2008a; PRICKETT et al., 2008b). Der Kaustick aus unbehandelter Baumwolle gewährleistet eine optimale Saugfähigkeit und ist biologisch abbaubar (Abbildung 6).

3. Material und Methode



Abbildung 6: Baumwollseil zur Gewinnung der Speichelproben beim Schwein (Sankt Josef Werkstatt, Dorfen, Deutschland)

Für die Gewinnung der Speichelproben wurden die Kaustricke an der Buchtenwand fixiert und nach einer Verweildauer von 30 Minuten in der Bucht wieder abgenommen (Abbildung 7). Für die Fixierung der Baumwollstricke (Sankt Josef Werkstatt, Dorfen, Deutschland) wurde ein Ende (1,5 cm) verknotet und durch ein weiteres Seil an der Buchtenwand fixiert, so dass sich das untere Ende des Kaustricks auf Schulterhöhe der Tiere befand. Damit die Tiere an dem Strick kauen konnten, wurde der Knoten am unteren Ende des Kaustrickes gelöst und der Strick aufgefädelt. Nachdem die Tiere an dem Kaustrick gekaut haben, legte man das untere Ende des Kaustricks mit der behandschuhten Hand in einem 30,48 x 17,78 cm großen verschließbaren Plastikbeutel (Ziplock Beutel). Durch Auswringen der Kaustricke konnte der Speichel an einer der unteren Ecken des Beutels gewonnen werden. Nach dem Abschneiden der Ecke wurde die Speichelprobe in einem 50 ml Polypropylen (PP)-Probenröhrchen dekantiert.

Die Proben wurden bis zum Eintreffen an der Vetmeduni Vienna mittels Cool Pack gekühlt gelagert. Um die Speichelprobe von Fremdbeimengungen zu befreien, wurden die 50 ml PP-Probenröhrchen bei $9000 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert. Der

3. Material und Methode

Überstand wurde in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen dekantiert und bei -80 °C bis zu weiterführenden Untersuchung gelagert.

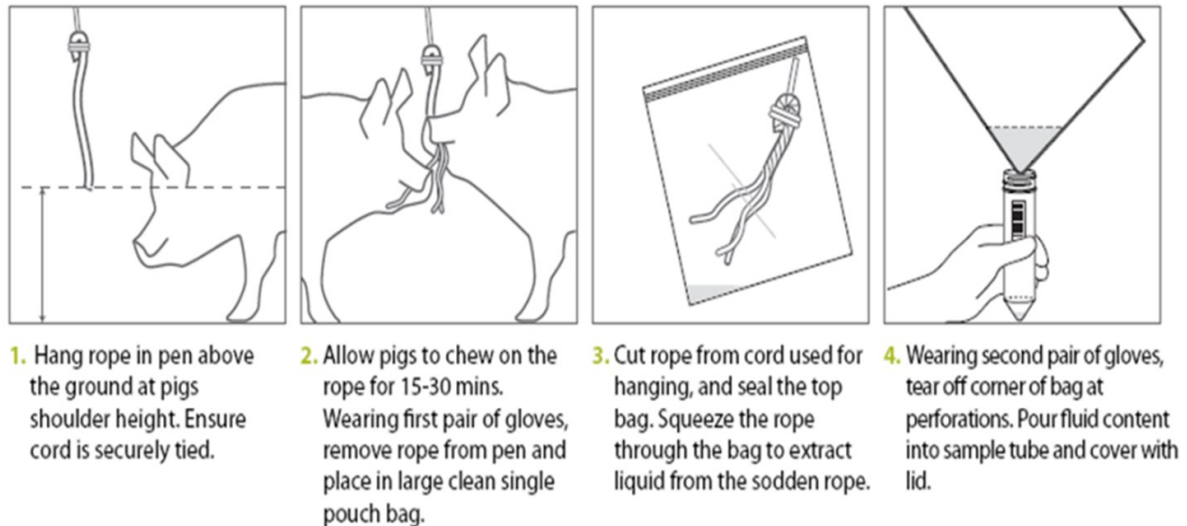


Abbildung 7: Gebrauchsanweisung zur Gewinnung der Speichelproben beim Schwein (TEGO, ILT Animal Healthcare, Melbourne, Australien)

3.4.2. Gewinnung der Serumproben

Die Blutentnahme erfolgte je nach Gewicht und Größe des Schweins aus der *Vena cava cranialis* bei Ferkeln, oder *Vena jugularis* bei Tieren über 20 kg Körpergewicht. Für die Blutentnahme aus der *Vena jugularis* werden die Schweine mittels Oberkieferschlinge fixiert. Der Kopf und Hals wird durch Zug nach oben gestreckt (BAUMGARTNER, 2009). Die Einstichstelle befindet sich in dorso-medio-caudaler Stichrichtung am Rande des *Musculus brachiocephalicus* auf einer gedachten Linie zur Brustbeinspitze (HEINRITZI, 2006; BAUMGARTNER, 2009). Bei den Ferkeln erfolgt die Blutentnahme aus der *Vena cava cranialis*. Das Ferkel wird durch eine Hilfsperson fixiert und der Hals gestrafft. Die Einstichstelle liegt dicht neben dem *Manubrium sterni* in Höhe der ersten Rippe. Es wird in leicht medialer Stichrichtung senkrecht zur Hautoberfläche eingestochen (HEINRITZI, 2006). Je nach Größe der Tiere konnten 7,5 bis 10 ml Blut in eine Serum-Monovette (KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) entnommen werden. Die gewonnen Blutproben wurden bis zum Eintreffen an der Vetmeduni Vienna gekühlt mittels Cool Pack gelagert. Für die Gewinnung der Serumproben wurden die Blutproben bei

3. Material und Methode

1000 × g für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurden die gewonnenen Serumproben bei -80 °C für weitere Untersuchungen gelagert.

3.5. Tier-Kaustrock-Interaktion

Die Kaustrocke wurden wie in 3.4.1. beschrieben den Schweinen präsentiert. Für die eindeutige Erkennung der Schweine wurden die Schweine mittels Viehzeichner für die spätere Identifikation individuell gekennzeichnet. Es wurden Kaustrocke in 31 Buchten mit Schweinen unterschiedlichen Alters aufgehängt und die Anzahl der Interaktion der Schweine mit dem Strick vermerkt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Aufteilung der Schweine pro Bucht und Alter

Lebenswoche		Anzahl der Tiere / Bucht			
7. bis 8.	13	17	22 bis 23	24 bis 25	29 bis 30
12.	< 20		20 bis 23	24	

Hierfür wurde im Minutenrhythmus die Interaktion der Tiere mit dem Strick notiert. Ein zehn sekündiges Benagen des Strickes durch die Schweine wurde als Interaktion mit dem Strick gewertet (Abbildung 8). Nach der 30-minütigen Strickpräsentation wurde der Strick ausgewrungen und die gewonnene Speichelmenge wurde gemessen. Im Anschluss wurden die Tier-Strick-Interaktionen der verschiedenen Altersstufen und Herdengrößen miteinander statisch verglichen.

3. Material und Methode



Abbildung 8: 30-minütige Kastrickpräsentation zur Gewinnung der Speichelproben; Schweine kauen am Baumwollseil

3.6. Labordiagnostische Verfahren

3.6.1. Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper im Serum

HerdChek® PRRS X3 (IDEXX Laboratories GmbH, Ludwigsburg, Deutschland) ist ein kommerziell erhältlicher „Enzymimmunoassay“ zum Nachweis von PRRSV-Antikörpern (IgG) in Schweineserum und -plasma. Für den Nachweis der PRRSV-spezifischen Antikörper wird ein rekombinantes PRRS-Virusantigen genutzt. Die Untersuchungen wurden mittels automatischen ELISA-System (DYNEX DS2 automated ELISA System, Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland) durchgeführt. Das verwendete Testsystem besitzt eine Spezifität von 99,9 % und eine Sensitivität von 98,8 %.

3. Material und Methode

3.6.1.1. Testprinzip

Die zu untersuchenden Proben wurden mittels Vortexen durchmischt und kurz zentrifugiert. Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht. Des Weiteren wurden die Proben mit dem Probenverdünner vierzigfach verdünnt. Es wurde eine Waschlösung aus dem Waschkonzentrat hergestellt. Hierfür wurden 1 Teil Waschkonzentrat und 9 Teile destilliertes Wasser gemischt. Für den Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper (Ak) wurden die Proben (100 µl) in die mit rekombinantem PRRS-Virusantigen beschichteten Vertiefungen der Testplatte gegeben. Die im Testsystem enthaltenden Positiv- und Negativkontrollen (100 µl) wurden unverdünnt in die Vertiefungen der Testplatte überführt. Nach einer Inkubationsphase (Bindung der PRRSV-spezifischen Akk. an das Antigen) von 30 Minuten (± 2 Minuten) wurden die Vertiefungen mit dem Waschpuffer drei- bis fünfmal gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Anti-Schwein-IgG Meerrettich-peroxidase (=HRPO)-Konjugat hinzugefügt und 30 Minuten (± 2 Minuten) inkubiert. Ungebundenes Konjugat wurde durch Waschen (drei- bis fünfmal) entfernt. TMB Substrat wurde in die Vertiefungen gegeben und nach einer fünfzehnminütigen Inkubationsphase wurde eine Stopplösung hinzugefügt. Durch das zugefügte Substrat kommt es einer Farbentwicklung in der Probe. Diese ist proportional zu der spezifisch gebundenen PRRSV-Antikörpermenge. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen.

Für jede Probe wurde das Verhältnis der Probe zur Positivkontrolle (P/PK-Verhältnis) ermittelt.

$$P/PK = \frac{P - NK (MW)}{PK (MW) - NK (MW)}$$

PK = Positivkontrolle; NK = Negativkontrolle, P = Probe, MW = Mittelwert

Für die Gültigkeit des Tests muss der Mittelwert der beiden Negativkontrollen eine optische Dichte von $\leq 0,150$ aufweisen. Der Mittelwerte der beiden Positivkontrollen minus der beiden Negativkontrollen muss $\geq 0,150$ sein. Proben mit einem P/PK-Verhältnis von $\geq 0,40$ sind als positiv zu werten.

3. Material und Methode

3.6.2. Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper im Speichel

Für den Nachweis von PRRSV-spezifischen Ak. im Speichel wurde der kommerziell erhältliche HerdChek® PRRS X3 (IDEXX Laboratories GmbH, Ludwigsburg, Deutschland) genutzt. Es wurde das in Punkt 3.6.1.1. beschriebenes Protokoll modifiziert. Das verwendete Testsystem besitzt eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 94,7 % (KITTAWORN RAT et al., 2012).

3.6.2.1. Durchführung Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper im Speichel mittels HerdChek® PRRS X3

Die zu untersuchenden Speichelproben wurden mittels vortexen durchmischt, kurz zentrifugiert und 1:2 mit dem Probenverdünner verdünnt. Die Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht. Die verdünnten Proben (250 µl) wurden in die mit rekombinantem PRRS-Virusantigen beschichteten Vertiefungen der Testplatte überführt. Die im Testsystem enthaltenden Positiv- und Negativkontrollen (100 µl) wurden 1:30 verdünnt und in die Vertiefungen der Testplatte gegeben. Nach einer Inkubationsphase (Bindung PRRSV-spezifische AK an das Antigen) von 16 Stunden (\pm 30 Minuten) wurden die Vertiefungen mit dem Waschpuffer drei- bis fünfmal gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Anti-Schwein-IgG Meerrettichperoxidase (=HRPO)-Konjugat hinzugefügt und 30 Minuten (\pm 2 Minuten) inkubiert (Bindung HPRO-Konjugat an haftende AK) und durch Waschen (drei- bis fünfmal) entfernt. TMB Substrat wurde in die Vertiefungen gegeben und nach einer fünfzehnminütigen Inkubationsphase wird die Stopplösung hinzugefügt. Durch das zugefügte Substrat kam es zu einer Farbentwicklung in der Probe. Diese ist proportional zur spezifisch gebundenen Anti-PRRSV-Antikörpermenge. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen (Microplate Reader Model 680 [Bio-Rad Laboratories GesmbH., Wien, Österreich]).

Für jede Probe wurde das Verhältnis der Probe zur Positivkontrolle (P/PK-Verhältnis) ermittelt.

$$P/PK = \frac{P - NK (MW)}{PK (MW) - NK (MW)}$$

PK = Positivkontrolle; NK = Negativkontrolle, P = Probe, MW = Mittelwert

3. Material und Methode

Für die Gültigkeit des Tests muss der Mittelwert der beiden Negativkontrollen eine optische Dichte von $\leq 0,150$ aufweisen. Der Mittelwert der beiden Positivkontrollen minus der beiden Negativkontrollen muss $\leq 0,150$ sein. Proben mit einem P/PK-Verhältnis von $\geq 0,40$ sind als positiv zu werten.

3.6.3. Extraktion viraler RNA aus Serum und Speichelproben

Für die Extraktion viraler RNA aus Speichel- und Serumproben wurde der QIAamp® Viral RNA Mini Kit und das RNase-Free DNase Set verwendet (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). Der QIAamp® Viral RNA Mini Kit eignet sich für die Extraktion viraler RNA aus Plasma, Serum, zellfreien Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberständen. Für eine effektive Verdauung der in der Probe enthaltenen DNA wurde das RNase-Free DNase Set (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) genutzt. Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Untersuchung mittels PCR bei -80 °C aufbewahrt.

3.6.3.1. Kontrollen

Zur Validierung der Extraktionsergebnisse wurden eine Positiv- und Negativkontrolle mit den zu untersuchenden Proben extrahiert.

Positivkontrollen:

Für die Herstellung der Positivkontrollen wurde Lebendvirus verwendet. Als Referenzstamm zum Nachweis von PRRSV Typ 1 und Typ 2 wurden ein attenuierter PRRSV-Impfstamm (Porcilis® PRRS, MSD, Boxmeer, Niederlande) und ein modifizierter PRRSV-Impfstamm (Ingelvac PRRS® MLV, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) genutzt. Beide Kontrollen wurden mit Serum bzw. Speichel 1:10 verdünnt.

Negativkontrollen:

Für die Herstellung der Negativkontrollen wurde steriles und RNase freies Wasser 1:10 mit Serum oder Speichel verdünnt.

3. Material und Methode

3.6.3.2. Durchführung der RNA Extraktion

Für die Extraktion der viralen RNA wurden die Serum- und Speichelproben, sowie eine Positivkontrolle und Negativkontrolle auf Zimmertemperatur (15-25 °C) aufgewärmt und mittels vortexen für 15 Sekunden (sec) durchmischt. Anschließend wurden die Proben bei $2.300 \times g$ für 30 sec zentrifugiert. Es wurden 140 µl der Probe in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert und mit 560 µl AVL Puffer mittels Vortexer 15 sec vermischt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur (15-25 °C) wurde die homogene Mischung aus Probe und Puffer erneut 15 sec gevortext und anschließend bei $2.300 \times g$ für 30 sec zentrifugiert, um entstandene Tropfen am Gefäßrand zu vermeiden. Nach dieser Inkubationszeit wurden 560 µl Ethanol (96-100 %) zugegeben und mittels Vortexer für 15 sec durchmischt. Um entstandene Tropfen am Gefäßrand zu vermeiden, musste die Probe kurz bei $6.000 \times g$ zentrifugiert werden. Es wurden 630 µl der Lösung in QIAamp Mini Spinsäule (in einem 2 ml Sammelröhrchen) ohne den Rand zu befeuchten pipettiert. Die Kappe des Sammelröhrchens wurde geschlossen und das Sammelröhrchen wurde bei $6.000 \times g$ für 1 Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit einem neuen Sammelröhrchen wiederholt, bis die Lösung die Filtermembran vollständig passiert hatte. 250 µl AW1 Puffer wurden der Probe zugeführt und bei $6.000 \times g$ für 1 Minute zentrifugiert. Für den DNA-Verdau wurden 10 µl DNase Stocklösung und 70 µl RDD-Puffer vermischt. 10 µl dieser Lösung wurden auf die Filtermembran der QIAamp Mini Spinsäule gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur (15-25 °C) inkubiert. Anschließend wurden 250 µl AW1 Puffer zugegeben und die QIAamp Mini Spinsäule bei $6.000 \times g$ für 1 Minute zentrifugiert. Nach dem die Probe zentrifugiert wurde, musste die QIAamp Mini Spin Säule in ein neues 2 ml Sammelröhrchen verbracht werden und das entstandene Filtrat verworfen werden. Anschließend wurden der QIAamp Mini Spin Säule 500 µl AW2 hinzugefügt und bei $20.000 \times g$ für 3 Minuten zentrifugiert. Die QIAamp Mini Spin Säule wurde erneut in ein 2 ml Sammelröhrchen verbracht und bei $20.000 \times g$ für 1 Minute zentrifugiert. Die QIAamp Mini Spin Säule wurde in ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gesteckt. 60 µl AVE Puffer wurden der Säule zugeführt und für 1 min inkubiert. Zum Schluss wurde die Säule bei $6.000 \times g$ für 1 Minute zentrifugiert. Das entstandene Eluat wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3. Material und Methode

3.6.4. Untersuchung auf PRRSV-spezifische Genomfragmente mittels qRT-PCR

Mit der qRT-PCR (Taqman NA und EU PRRSV Reagents, Applied Biosystems, Foster City, USA) wurde die aus den Serum und Speichelproben potentiell extrahierte virale RNA vervielfältigt. Durch die Zugabe spezifischer Primerpaare war es möglich, die potentiell in der Probe enthaltene PRRSV-spezifische RNA zu amplifizieren. Dies wurde entsprechend dem empfohlenen Thermalprofil für 45 Zyklen durchgeführt.

3.6.4.1. Kontrollen

Positivkontrolle:

Als Positivkontrolle für PRRSV Typ 1 und Typ 2 wurden kommerziell erhältliche Positivkontrollen (TaqMan® NA and EU PRRSV and Xeno™ RNA Controls; Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet.

Negativkontrolle:

Als Negativkontrolle wurde steriles und RNase-freies Wasser in die qRT-PCR eingesetzt.

3.6.4.2. Spezifische Primerpaare

Für den Nachweis von PRRSV-Genomfragmente wurden Primerpaare zur Amplifizierung des ORF7 verwendet. 5'-TCAICTGTGCCAGITGCTGG-3' wurde als Vorwärtsprimer und 5'-AAATGIGGCTTCTCIGGITTTT3' wurde als Rückwärtsprimer genutzt (EGLI et al., 2001). Die verwendeten Primerpaare ergaben ein 105 bp (Basenpaare; Typ 2) und 96 bp (Typ 1) langes DNA-Fragment.

Für die Unterscheidung des Typ 1 vom Typ 2 wurden in der qPCR zwei verschiedene TaqMan®-Sonden genutzt:

Typ 1: 5'-CCCAGCGCCAGCAACCTAGG-3', VIC am 5'-Terminus (Reporter) und TAMRA am 3' Ende (Quencher)

Typ 2: 5'-TCCCGGTCCCTTGCCCTCTGGA-3', FAM am 5'-Terminus (Reporter) und TAMRA am 3' Ende (Quencher)

3. Material und Methode

3.6.4.3. Durchführung der qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde mit einem Reagenzset, Taqman NA und EU PRRSV Reagents (Applied Biosystems, Forster City, USA), durchgeführt. Für die qRT-PCR wurde das Stratagene MX 3005P System (Agilent Technologies, Santa Clara USA) verwendet. Die RNA-Genomfragmente wurden in DNA transkribiert und durch Taq-DNA Polymerase amplifiziert. Dies wurde in einer Singletube one-step real-time RT-PCR Reaktion durchgeführt. Um die Qualität zu prüfen wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Der Mastermix wurde laut Gebrauchsanweisung hergestellt (Tabelle 7). Als Kanäle für die Auswertung der Probe wurden Cy3 (EU-Typ), Cy5 (Xeno™ Kontrolle) und FAM (US-Typ) genutzt. Als Referenzkanal wurde ROX gewählt. Die PCR wurde nach dem in Tabelle 8 zusammengefassten Thermalprofil durchgeführt.

Tabelle 7: Mastermixzusammensetzung der quantitativen reverse transcriptase (qRT)-PCR

Komponente	Konz. Gebrauchslösung	Konz. im PCR-Ansatz	Volumen in µl für 1x
H ₂ O RNA-PCR grade			6,75 µl
2x Multiplex RT-PCR Puffer	2x	1x	12,5 µl
10x PRRSV Primer Probe Mix	10x	1x	2,5 µl
20x Multiplex Enzyme Mix	20x	1x	1,25 µl
Volumen Mastermix			23 µl
Zugabe von Proben RNA, Extraktions-,			+ 2,0 µl
Mastermix-, Positiv-Kontrolle			
Totales Volumen PCR Ansatz			25 µl

3. Material und Methode

Tabelle 8: Verwendetes Thermalprofil

Programm-Eigenschaften	°C	Zeit in min:sec
Reverse Transkription	48	30:00
Initiale Denaturierung / Enzymstart	95	15:00
45 Zyklen		
Denaturierung	95	0:15
Primer / Sonden-Anlagerung + Extension	60	1:00

Für den automatischen Ablauf der qRT-PCR wurden die Standardeinstellung bezüglich der Datenaufnahme und -analyse, d. h. Thershold-Einstellung, verwendet. Proben mit einem Ct („cycle threshold“) von < 40 Zyklen waren positiv, ≥ 40 Zyklen waren negativ. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der MxPro QPRC Software 4.0 (Aligent Technologies, Santa Clara, USA). Die Anzahl der Kopien pro Probe wurden mit dem Faktor 497 multipliziert und auf Kopien pro ml umgerechnet.

3.6.5. RT-PCR zum Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente

Mit der konventionellen RT-PCR wurde die aus dem Serum- und den Speichelproben potentiell extrahierte PRRSV-RNA vervielfältigt. Die konventionelle RT-PCR wurde entsprechend dem Protokoll von BALKA et al. (2008) durchgeführt. Im Anschluss wurden die erzeugten PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese dargestellt und analysiert.

3.6.5.1. Kontrollen

Positivkontrolle:

Als Positivkontrolle für PRRSV Typ 1 und Typ 2 wurden kommerziell erhältliche Positivkontrollen (TaqMan[®] NA and EU PRRSV and Xeno[™] RNA Controls, Applied Biosystems, Forster City, USA) verwendet. Es wurde eine definierte Menge von 80 Kopien / 1µl in die RT-PCR-Reaktion eingesetzt.

Negativkontrolle:

Als Negativkontrolle wurde RNase-freies, steriles Wasser in die qRT-PCR eingesetzt.

3. Material und Methode

3.6.5.2. Spezifische Primerpaare

Für den Nachweis von PRRSV-Genomfragmenten wurden Primerpaare zur Amplifizierung des ORF7 und die 30 „noncoding region“ (385 bp Typ 1; 410 bp Typ 2) gewählt. Als Vorwärtsprimer wurde 5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTG-3' und Rückwärtsprimer wurde 5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTG-3' genutzt.

Die jeweilige Primer-Stammlösung wurde mit 1 ml TE-Puffer hergestellt und die Konzentration in μM berechnet (Konzentration Stammlösung 100 μM). Die verwendete Gebrauchslösung wurde mit RNase-freien, sterilen Wasser auf 40 μM eingestellt.

3.6.5.3. Herstellung des Mastermixes

Tabelle 9: Mastermixzusammensetzung der konventionellen RT-PCR.

Komponente	Konz. Gebrauchslösung	Konz. im PCR-Ansatz	Volumen in μl für 1x
H ₂ O PCR grade			5,7 μl
5x Puffer (Qiagen Kit)	5x	1x	2 μl
dNTPs (Qiagen Kit)	10 mM	0,4 mM	0,4 μl
PRRS fw Primer	40 μM	0,8 μM	0,2 μl
PRRS re Primer	40 μM	0,8 μM	0,2 μl
RNase Inhibitor (Ribolock)			0,1 μl
Enzym Mix (Qiagen Kit)	10 μM	0,5 μM	0,4 μl
Volumen Mastermix			9 μl
Volumen Proben, Extraktions-, Mastermixkontrollen			1 μl
Totales Volumen			10 μl

3.6.5.4. Template-Zugabe

Die Extrakte und die Kontrollen wurden gevortext und kurz zentrifugiert ($6.000 \times g$ für 2-3 sec). Im Anschluss wurden 1 μl der Extrakte und Kontrollen dem Mastermix (9 μl) zugegeben und kurz zentrifugiert (2-3 sec).

3. Material und Methode

3.6.5.5. Durchführung der RT-PCR

Die konventionelle RT-PCR wurde entsprechend dem Protokoll von BALKA et al. (2008) durchgeführt. Die virale RNA wurde nach dem in Tabelle 10 dargestellten Thermalprofil in DNA transkribiert und anschließend amplifiziert. Für die Vervielfältigung der PRRSV-spezifischen Genomfragmente wurde der Biometra T300 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) verwendet.

Tabelle 10: Thermalprofil für Thermocycler

Programm-Eigenschaften	°C	Zeit in min:sec
Reverse Transkription	50	30:00
Initiale PCR Aktivierung	95	15:00
35 Zyklen		
Denaturierung	94	1:00
Primer-Anlagerung	50-68	1:00
Extension	72	1:00
Finale Extension	72	10:00

3.6.6. Gelelektrophorese

3.6.6.1. Herstellung Agarosegel

Zur Herstellung der Agarosegele wurden 2 g Agarose mit 110 ml 1 x TAE-Puffer vermischt. Damit sich die Agarose auflösen konnte, wurde die Mischung in der Mikrowelle unter mehrmaligen Schwenken für zwei Minuten erhitzt, bis keine Agarosekristalle im Gegenlicht mehr sichtbar waren. Die Flüssigkeit wurde 10 Minuten auf einem Magnetrührer auf eine Temperatur < 60 °C abgekühlt. Pro 100 ml Agaroselösung wurden 6 µl Midori Green DNA- und RNA Farbstoff (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) zugegeben und mittels Magnetrührer vermischt. Es wurde der Gelträger in den Gelgießstand eingespannt und die Gelkämme wurden in die vorgesehene Position gesteckt. Im Anschluss wurde die Agarosematrix in den vorbereiteten Gelgießstand gegossen und zum Aushärten 30 Minuten lichtgeschützt gelagert. Beim Dekantieren der Agarosematrix sollte eine Luftblasenbildung vermieden werden. Nachdem das Gel ausgehärtet war

3. Material und Methode

konnten die Kämme vorsichtig aus den Geltaschen gezogen werden und das Gel in Elektrophoresekammer überführt werden.

3.6.6.2. Durchführung der Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurde das Agarosegel in der Elektrophoresekammer mit 1 x TAE-Laufpuffer vollständig bedeckt (Flüssigkeitsstand 1-2 mm über dem Gel). Im Anschluss wurden 3 µl Ladepuffer mit dem PCR-Produkt (10 µl) vermischt und kurz zentrifugiert. Das Gemisch aus Ladepuffer und PCR-Produkt wurde in eine Geltasche pipettiert. Am Anfang jeder Reihe wurden 7,5 µl DNA-Marker (Standard) in die Geltaschen pipettiert. Für die Validierung der Elektrophorese und PCR wurden in jede Reihe eine positive und negative PCR-Kontrolle pipettiert (Abbildung 9).

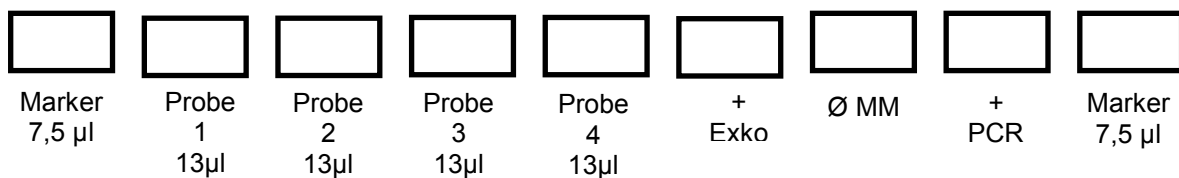


Abbildung 9: Pipettierschema für die Gelelektrophorese. + Exko: positive Extraktionskontrolle; Ø MM: negative Mastermixkontrolle; + PCR: positive PCR-Kontrolle

Nach der Belegung der Geltaschen wurde die Kathode links und die Anode rechts in Laufrichtung angelegt. Die negativ geladenen PCR-Produkte konnten so vom Plus- zum Minuspol durch das Gel wandern. Für die adäquate Auftrennung der PCR-Produkte wurde im Netzgerät (Electrophorese Power supply Model 250 EX, Life Technologies, Carlsbad, USA) eine Laufzeit von 45 Minuten bei 110 Volt programmiert und eingeschaltet.

3.6.6.3. Fotodokumentation

Das Gelbild wurde mittels einem Geldokumentations-System (INTAS Gel imager Biometra, Göttingen, Deutschland) aufgenommen. Das Gel wurde auf den UV-Tisch mit den Gelkammern nach oben in der Kammer ausgerichtet und fotografiert.

3. Material und Methode

3.6.6.4. Auswertung

Die Auswertung der PCR-Produkte („Banden“) erfolgte mit Hilfe des DNA-Marker, der sich am Anfang und am Ende einer Probenserie (Reihe) befand. Die Größe der Banden (Anzahl der bp) wurde mit den Angaben der Amplifikationsgröße, sowie mit den Banden der Positivkontrolle verglichen und ausgewertet. Anhand der Größe der Basenpaare konnte zwischen PRRSV Typ 1 und Typ 2 unterscheiden werden. Das Ergebnis wurde als Ausdruck dokumentiert und zusammen mit einem Elektrophorese-Protokoll asserviert (Abbildung 10).

Für die Interpretation der Ergebnisse mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

1. Die Negativkontrolle durfte in der Gelelektrophorese keine Banden aufweisen.
2. Die Positivkontrolle musste in der Gelelektrophorese eine Bande mit spezifischer Fragmentlänge haben.

Wurden diese Kriterien erfüllt, galten die in der Elektrophorese dargestellten Ergebnisse als valide und konnten ausgewertet werden. Beim Fehlen eines der Kriterien wurde die PCR wiederholt.

3. Material und Methode

Gelelektrophorese - Protokoll			
PCR: PRRSV / Laufzeit 45 Min, 110 V		Datum:	
Standard / Charge: 100 bp		Gel / Reihe	Kürzel:
Position	Proben ID	Ergebnis/Auswertung	Bemerkung
1	Stdd		
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20	Stdd		

Abbildung 10: Gelelektrophorese-Protokoll, zur Identifikation der auftragenden Proben;
bp: Basenpaare; Min: Minute; V: Volt; Stdd: Standard

3.7. Statistische Auswertung

Der erhobenen Befunde wurden statistisch erfasst und berechnet. Ergebnisse waren statistisch signifikant bei $p \leq 0,05$. Die statistische Einheit für die Analysen waren zum einen die Einzeltiere und zum anderen die Bucht (Gruppe). Die statistische Auswertung wurde mittels SPSS® 20 (IBM, Wien, Österreich) und Microsoft Excel 2010 durchgeführt.

Für die statistische Berechnung der Tier-Strick-Interaktion wurden die Ergebnisse auf Normalverteilung der Werte geprüft. Die Mittelwerte der Tier-Strick-Interaktion wurden mittels einer kovariaten Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANCOVARM) und Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVARM) unter

3. Material und Methode

Anwendung eines post-hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur auf signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den verschiedenen Herdengrößen beider Altersklassen überprüft, wobei die Zeit (5 Minutenintervall) als r_m -Faktor in dem Modell berücksichtigt wurden. Die Mittelwerte der gewonnenen Menge an Speichel und die Mittelwerte der prozentuellen Gesamtanzahl der Tiere die am Strick gekaut haben wurde unter Verwendung einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unter Anwendung eines post-hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur verifiziert.

Die erhobenen ELISA-Ratios (P/PK-Verhältnisse) wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung überprüft und mittels Kruskal-Wallis-Test zwischen der Zuchtsauenherde und den Aufzucht- und Zuchtferkeln verglichen. Die Übereinstimmung der ELISA- und PCR-Ergebnisse wurden in den verschiedenen Altersgruppen mittels Chi-Quadrat (χ^2) überprüft. Die Übereinstimmung der Resultate der ELISA- und PCR-Untersuchungen der Speichel und Serumproben wurden ebenfalls auf ihre Verteilung mittels χ^2 überprüft. Das Maß der Übereinstimmung wurde mit Kappa festgelegt. Die erhobenen Kappa (κ) Werte wurden folgendermaßen interpretiert: 0,0 = schlechte Übereinstimmung der Ergebnisse, 0,01-0,2 = geringfügige Übereinstimmung der Ergebnisse, 0,21-0,40 = ausreichende Übereinstimmung der Ergebnisse, 0,41-0,60 = mittlere Übereinstimmung der Ergebnisse, 0,61-0,80 = wesentliche Übereinstimmung der Ergebnisse und 0,81-0,99 = annähernd vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse (VIERA and GARRETT, 2005). Für die Berechnung der Virus-, sowie der Sero-Prävalenz wurde eine hypergeometrische Verteilung mit Maximum-Likelihood Beurteilung aus der Stichprobe durchgeführt.

4. Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1. Tier-Strick-Interaktion

Die Tier-Strick-Interaktion wurde bei insgesamt 31 Buchten beobachtet. Die Auswertung der Ergebnisse der Tier-Strick-Interaktion wurde in zwei Altersklassen (7. / 8. Lebenswoche und 12. Lebenswoche) und Buchtengröße aufgeteilt. Der präsentierte Baumwollstrick wurde von den Schweinen akzeptiert und von den Schweinen benagt. In einer Bucht haben keine Schweine während der Expositionsdauer von 30 Minuten am Strick gekaut.

Während einer 30-minütigen Strickexposition haben durchschnittlich 75,9 oder 79,4 % der Schweine in der 7. / 8. Lebenswoche und 12 Lebenswoche am Strick gekaut. In 30 Minuten wurden im Durchschnitt 161,4 Interaktionen in der 7. / 8. Lebenswoche und 170,8 Interaktionen in der 12. Lebenswoche beobachtet. Nach einer Expositionsdauer von 30 Minuten haben in der 7. / 8. Lebenswoche im Mittel zwischen 59,9 % (29-30 Schweine / Bucht) bis 96,5 % (19 Schweine / Bucht) gekaut. In der 12. Lebenswoche haben im Mittel 75,6 % (<20 Schweine / Bucht) bis 83,5 % (20-23 Schweine / Bucht) der Schweine am Strick gekaut (Abbildung 11 und Abbildung 12). Der höchste Anstieg des Mittelwerts des prozentuellen Anteils von Schweinen war in den ersten 15 Minuten (59,9-96,5 %) in der 7. / 8. Lebenswoche und den ersten 5 Minuten (59,3-66,8 %) in der 12. Lebenswoche zu erkennen. Analysen in 5 Minutenintervallen zeigten einen stetigen und signifikanten Anstieg der Mittelwerte des Anteils der Tiere bis zur 20. Minute (5-10 Minuten [$p = 0,001$], 10-15 Minuten [$p = 0,004$], 15-20 Minuten [$p = 0,003$] bzw. 10. Minute (5-10 Minuten [$p = 0,003$]) in der 7. / 8. und 12. Lebenswoche. Im Anschluss konnte kein signifikanter Anstieg der Mittelwerte des Anteils an Schweinen die am Strick gekaut haben nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

Die Buchtengröße und das Alter der Schweine hatte im Vergleich zur Dauer der Strickexposition keinen signifikanten Einfluss auf den Mittelwert der Anzahl der Schweine die an dem Strick gekaut haben ($p > 0,05$).

4. Ergebnisse

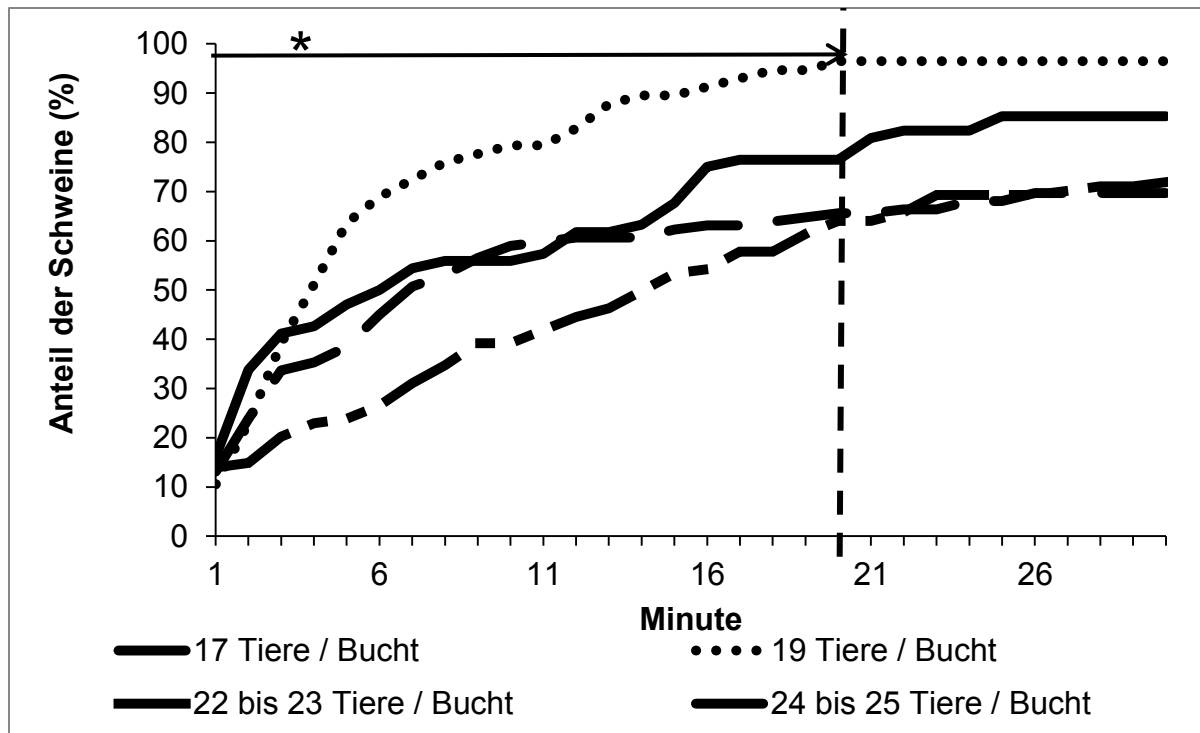


Abbildung 11: 7. Lebenswoche. Prozentueller Anteil der Schweine am Kaustrick innerhalb von 30 Minuten. *signifikanter Anstieg des Anteils der Schweine bis Minute 20

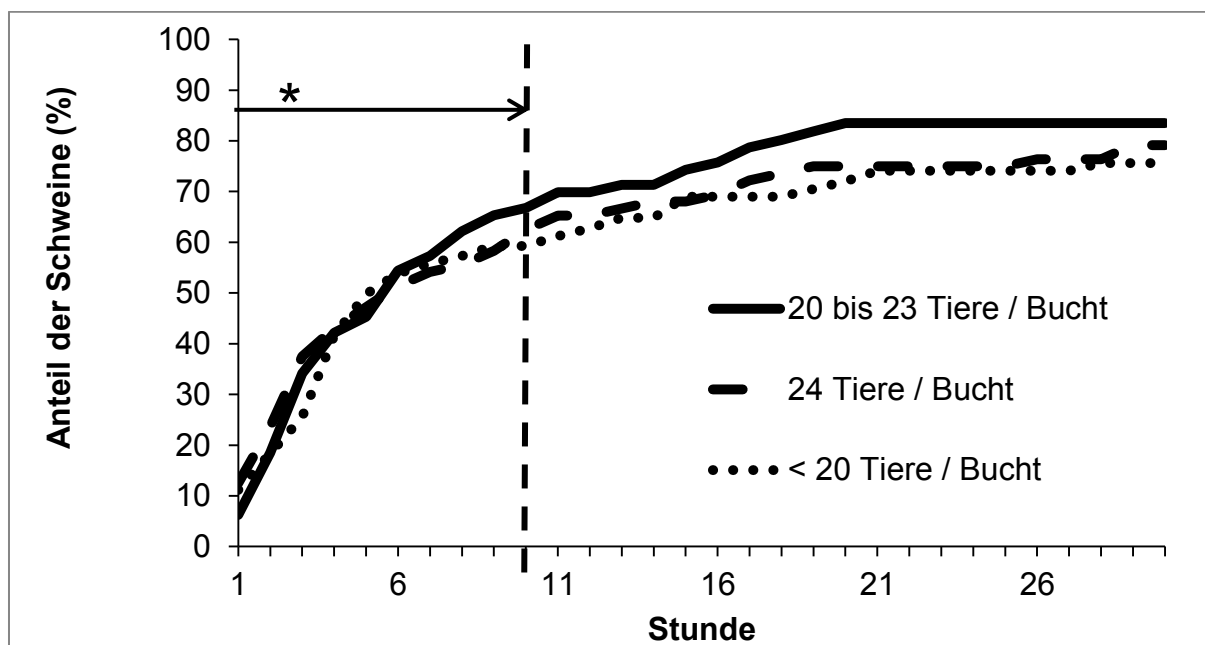


Abbildung 12: 12. Lebenswoche; prozentueller Anteil der Schweine am Kaustrick innerhalb von 30 Minuten. * signifikanter Anstieg des Anteils der Schweine bis Minute 10

4. Ergebnisse

Für die in dieser Studie verwendeten diagnostischen Analysen (ELISA [100 µl] und PCR [140 µl]) wurden 250 µl benötigt. Die Menge des gesammelten Speichels pro Bucht war für die verwendeten diagnostischen Analysen ausreichend. Die Mittelwerte der gewonnenen Speichelmengen pro Bucht zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Buchtengrößen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Mittelwerte der gewonnenen ml nach einer Strickexposition von 30 Minuten.

LW	Buchtengröße	Gewonnene ml
7. / 8.	17	2,83 ±1,7
	19	6,73 ±3,04
	22 bis 23	3,46 ±2,88
	24 bis 25	4,2 ±1,3
	29 bis 30	5,9 ±1,27
12.	20 bis 23	6,77 ±6,6
	24	12,33 ±8,22
	< 20	6,6 ±0,35

4.2. Effekt der Lagerungszeit und -temperatur auf den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente

Die für diese Studie ausgewählten Schweine waren PRRSV negativ. Mittels PCR konnten keine PRRSV-spezifische RNA und mittels ELISA keine Antikörper gegen PRRSV nachgewiesen werden. Die Speichelproben wurden von den Schweinen mittels Kaustick entnommen. Der gewonnene Speichel wurde mit $2,49 \times 10^7$ PRRSV-Viruskopien gespiket.

Das PRRSV-Genom konnte reproduzierbar in den gespikten Speichelproben (n = 58) mittels qRT-PCR nachgewiesen werden. Die PRRSV-spezifischen Genomfragmente waren bei beiden Probenentnahmesystemen (TEGO und BB) für 72 Stunden in einem Temperaturbereich von -20-10 °C im Speichel nachweisbar. Im zeitlichen Verlauf konnte über 72 Stunden eine Reduktion der Mittelwerte der Viruskopien / ml bei allen Lagerungstemperaturen nachgewiesen werden (Abbildung 13). Nach 12 Stunden konnte bei -20 °C (TEGO-Testsystem) und 4 °C (BB-Testsystem) eine Verdopplung des Reduktionsfaktors von 1,3 auf 2,6 (-20 °C; TEGO-Testsystem) bzw.

4. Ergebnisse

1,2 auf 2,5 (4 °C BB-Testsystem) festgestellt werden. Nach 48 Stunden war bei allen Lagerungstemperaturen und Testsystemen eine deutliche Reduktion der Viruskopien nachweisbar (Tabelle 12).

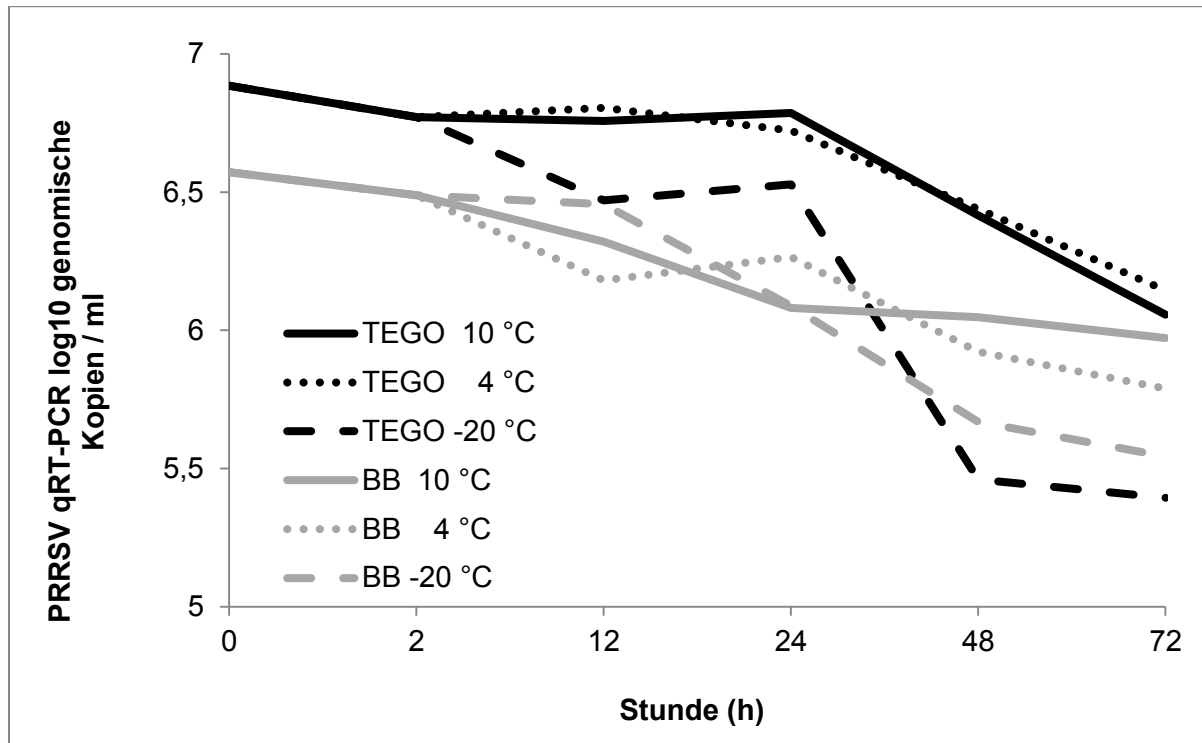


Abbildung 13: Einfluss der Lagerungszeit und -temperatur auf den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente in einem Zeitintervall von 72 Stunden (h). BB: Baumwollstricke St. Josef Werkstatt; TEGO: TEGO oral fluid Kit.

Die geringste Reduktion der Anzahl der Viruskopien / ml war beim TEGO-Testsystem bei 4 °C (Faktor 5,5) und beim BB-Testsystem bei 10 °C (Faktor 4). Der höchste Verlust an Viruskopien / ml wurde bei -20 °C (TEGO: Faktor 30,9; BB: Faktor 10,7) festgestellt (Tabelle 12).

4. Ergebnisse

Tabelle 12: Reduktionsfaktor der Anzahl an genomischen Kopien / ml im zeitlichen Verlauf von 92 Stunden. vs: versus; BB: Baumwollstricke St. Josef Werkstatt; TEGO: TEGO oral fluid Kit.

Testkit	Lagerungs- temperatur	Stunde				
		0 vs 2	0 vs 12	0 vs 24	0 vs 48	0 vs 72
TEGO	10	1,30	1,34	1,26	2,95	6,74
	4	1,30	1,20	1,45	2,79	5,50
	-20	1,30	2,60	2,28	26,61	30,94
BB	10	1,21	1,79	3,10	3,35	3,98
	4	1,21	2,47	2,03	4,47	6,07
	-20	1,21	1,31	3,05	8,02	10,70

Der Zusatz von EDTA und SDS, Proteinase K, Chlorhexidin, sowie eine höhere Zentrifugation der Proben brachte keine deutliche Verbesserung im Nachweis von PRRSV-spezifischen Genomfragmenten. Der Zusatz von Proteinase K führte zu einem Verlust viraler Kopien / ml von einer Zehnerpotenz (Tabelle 13).

Tabelle 13: Einfluss der Behandlung des Speichels auf den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente. BB = Baumwollstricke St. Josef Werkstatt; TEGO = TEGO oral fluid Kit.

TEGO / BB	Behandlung	0 h	2 h
TEGO	Raumtemperatur	$6,64 \times 10^6$	$5,11 \times 10^6$
	EDTA	$2,45 \times 10^6$	$1,47 \times 10^5$
	Proteinase K	$2,85 \times 10^5$	$1,60 \times 10^5$
	Chlorhexidin	$6,94 \times 10^6$	$2,39 \times 10^6$
	Scheren + hohe Zentrifugation	$6,25 \times 10^6$	$3,56 \times 10^6$
	Scheren + Sterilfilter	$4,93 \times 10^6$	$4,08 \times 10^6$
	Cool Pack	$6,64 \times 10^6$	$4,98 \times 10^6$
BB	Raumtemperatur	$4,13 \times 10^6$	$3,13 \times 10^6$
	EDTA	$2,98 \times 10^6$	$4,13 \times 10^5$
	Proteinase K	$2,59 \times 10^5$	$1,16 \times 10^5$
	Chlorhexidin	$4,95 \times 10^6$	$2,96 \times 10^6$
	Scheren + hohe Zentrifugation	$4,72 \times 10^6$	$2,61 \times 10^6$
	Scheren + Sterilfilter	$3,45 \times 10^6$	$2,54 \times 10^6$
	Cool Pack	$4,13 \times 10^6$	$3,19 \times 10^6$

4.3. Ergebnisse Betriebe

In keinem Studienbetrieb wurde gegen das PRRSV geimpft. Die Zuchtsauen wurden gegen Parvovirose und Rotlauf in allen Betrieben, sowie gegen Influenza A im Betrieb 2 und gegen *Escherichia coli* und *Pasteurella multocida toxigenica* im Betrieb 4 geimpft. Alle Ferkel wurden gegen das porcine Circovirus Typ 2 und

4. Ergebnisse

Mycoplasma hyopneumoniae geimpft. In Summe wurden 539 Serumproben und 58 Speichelproben mittels RT-PCR und ELISA auf das Vorhandensein PRRSV-spezifischer Genomfragmente und Antikörper untersucht. Die erhobenen Rohdaten des Virus- und Antikörpernachweises sind im Anhang dargestellt.

4.3.1. Ergebnisse der RT-PCR- und ELISA-Untersuchung aus Serumproben

Die Ergebnisse des Virus- und Antikörpernachweises der vier Betriebe sind in Tabelle 20 aufgelistet. In den Serumproben des zweiten Betriebes konnten weder PRRSV-spezifische Genomfragmente, noch Antikörper gegen PRRSV nachgewiesen werden. Drei Zuchtsauen aus dem dritten Betrieb waren serologisch positiv. PRRSV-spezifische Genomfragmente und Antikörper konnten in den Serumproben der Schweine aus Betrieb 1 und 4 nachgewiesen werden. Insgesamt konnten bei 55 Zuchtsauen (16 [B1]; 4 [B3]; 35 [B4]) und 28 Aufzucht- und Zuchtferkeln (14 [B1]; 14 [B4]) Antikörper gegen PRRSV nachgewiesen werden. In der PCR waren 4 Zuchtsauen aus dem vierten Betrieb und 17 Aufzucht- und Zuchtferkel (11 [B1]; 6 [B4]) positiv (Tabelle 14). Die nachgewiesenen PRRSV-spezifischen Genomfragmente waren Feldstämmen zuzuordnen und gehörten zum PRRSV Typ1 (Abbildung 14).

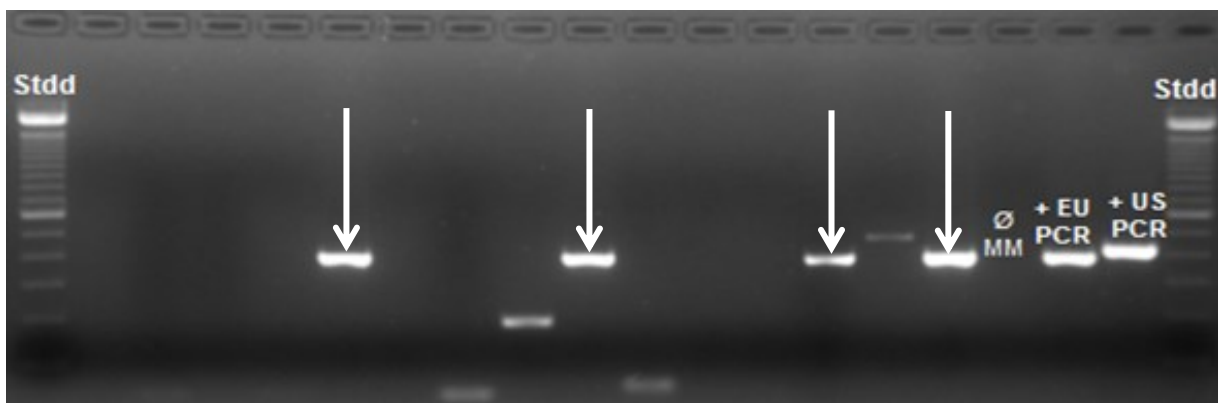


Abbildung 14: Darstellung RT-PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese. Nachgewiesen wurden RT-PCR-Produkte des ORF („open reading frame“) 7. Positive PCR-Produkte hatten eine Größe von 385 bp (Basenpaare) Typ 1 und 410 bp Typ 2. Stdd: Standard; Ø MM: negative PCR-Kontrolle; + EU PCR: positive PCR Kontrolle EU-Typ; + US PCR: positive PCR Kontrolle US-Typ

4. Ergebnisse

Für die weitere Auswertung wurden die Laborergebnisse der PRRSV-positiven Betriebe (B1 und B4) herangezogen.

Die P/PK-Verhältnisse zeigten einen Interquartilbereich von 0,241 und 0,031 bei den Zuchtsauen bzw. Aufzucht- und Zuchtferkeln. Signifikante Unterschiede der P/PK-Verhältnisse zeigten sich zwischen der Sauengruppe und den Aufzucht- und Zuchtferkeln ($p = 0,016$) (Abbildung 15). Der Median der P/PK-Verhältnisse war in der Zuchtsauenherde 0,27 und in der Aufzucht- und Zuchtferkelherde 0,73. In der Aufzucht- und Zuchtferkelherde waren im Vergleich signifikant mehr Schweine PRRSV-Antikörper positiv als in der Zuchtsauenherde ($p = 0,032$).

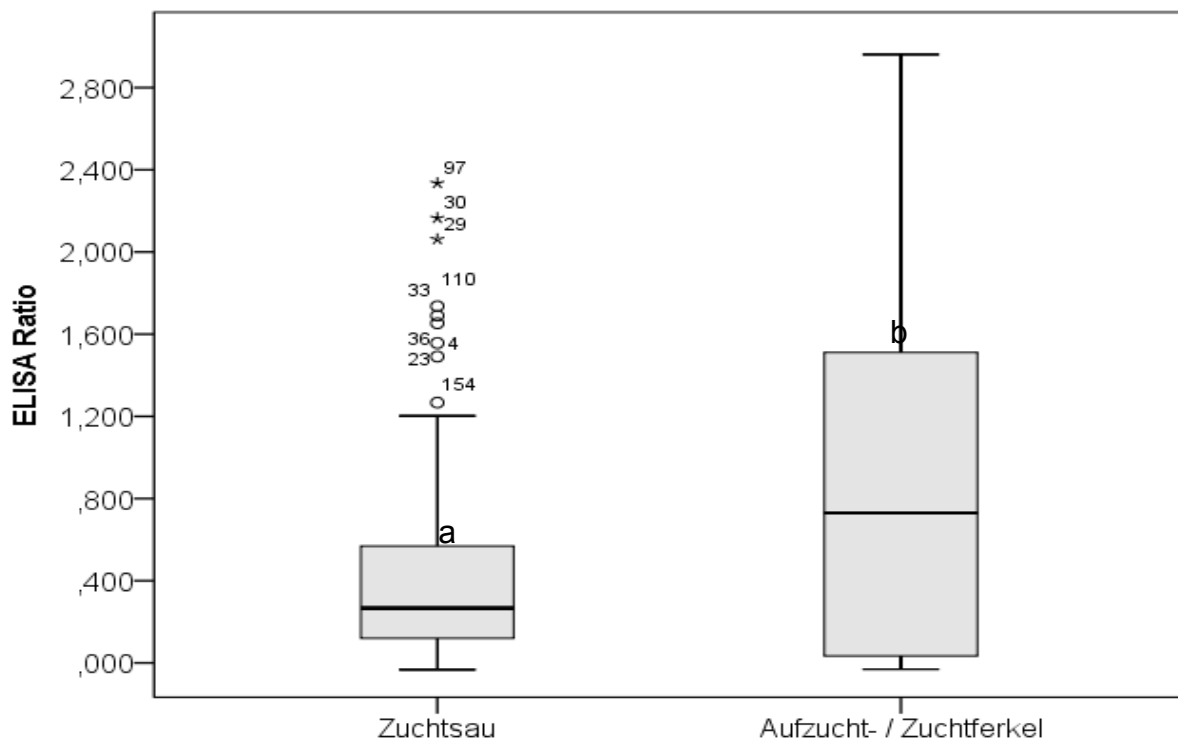


Abbildung 15: Spannweite ELISA P/PK-Verhältnis Ergebnisse der Serumproben aus Betriebe 1 und 4. Die ELISA Ergebnisse wurden anhand der Altersklassen aufgelistet. Proben mit einem P/PK-Verhältnis von $\geq 0,40$ sind als positiv zu werten. Signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen (a/b $p = 0,016$). AF: Aufzucht- und Zuchtferkel

In Tabelle 14 ist das Verhältnis der Ergebnisse der PCR- und ELISA Untersuchung dargestellt. Die dargestellten Ergebnisse zeigten, dass bei den Zuchtsauen 86 von 140 Serumproben in der PCR, sowie im ELISA negativ gewesen waren. Eine Probe

4. Ergebnisse

war im ELISA und in der PCR positiv. Bei den Aufzucht- und Zuchtferkeln waren 17 von 50 Serumproben bei beiden Testsystemen negativ und 12 Proben positiv. Diese geringe Übereinstimmung bestätigte sich durch die berechneten Kappa (κ)-Werte. Es bestand eine geringfügige und nicht signifikante Übereinstimmung zwischen den ELISA und PCR Ergebnissen ($\kappa = 0,018$; $p = 0,537$ [Zuchtsauen]; $\kappa = 0,191$; $p = 0,229$ [Aufzucht- und Zuchtferkel]).

Tabelle 14: Anzahl positiver und negativer PCR und ELISA Ergebnisse; a: Ergebnisse Zuchtsauen ($\kappa = 0,018$; $p = 0,537$); b: Ergebnisse Aufzucht- und Zuchtferkel ($\kappa = 0,191$; $p = 0,229$)

Testverfahren		PCR		PCR	
		negativ	positiv	negativ	positiv
ELISA	negativ	86a	3a	17b	5b
	positiv	50a	1a	16b	12b

4.3.2. Sero- und Virusprävalenz

Die berechnete Sero- und Virusprävalenz in den vier Studienbetrieben ist in Tabelle 20 dargestellt. Für die Berechnung der Sero- und Virusprävalenz wurden die Befunde aus den Betrieben 1 und 4 herangezogen.

Die berechnete Sero- und Virusprävalenz war in der Aufzucht- und Zuchtferkelherde am höchsten. Die Mittlere Seroprävalenz lag in der Zuchtsauenherde bei 36 % (36-37 %) und in der Aufzucht bei 67 % (40-94 %). Die durchschnittliche Virusprävalenz betrug 1 % (0,4-2 %) in der Zuchtsauenherde und 36 % (32-40 %) in der Aufzucht- und Zuchtferkelherde (Tabelle 15). Die Mittlere Virusprävalenz der gewonnenen Speichelproben lag bei 30 % (26-34 %) und die mittlere Seroprävalenz bei 83 % (76-90 %; Tabelle 15).

4. Ergebnisse

Tabelle 15: Aufzucht- und Zuchtferkel. PCR und ELISA Ergebnisse der Speichel- und Serumproben im Vergleich. pos: positive Ergebnisse

Betrieb	Nachweis- verfahren	Speichelproben			Serumproben		
		Anzahl untersuchter Proben (n)	pos. Proben	Prävalenz (%)	Anzahl untersuchter Proben (n)	pos. Proben	Prävalenz (%)
B1	ELISA	12	9	76	35	14	40
	PCR		3	26		11	32
B4	ELISA	9	8	90	15	14	94
	PCR		3	34		6	40
B1+B4	ELISA	21	17	83	50	28	67
	PCR		6	30		17	36

Anhand der erhobenen Sero- und Virusprävalenz konnte die minimale Stichprobengröße ermittelt werden (Tabelle 16). Die Stichprobengröße variierte zwischen drei und neun Proben für den Nachweis seropositiver Schweine. Der niedrigste Stichprobenumfang für den Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper wurde für die Speichelproben (drei Proben) berechnet. Die höchste Probenanzahl wurde für den Virusnachweis in der Zuchtsauenherde mit 95 berechnet (Tabelle 16).

Tabelle 16: Übersicht durchschnittlichen Sero- und Virusprävalenz, sowie benötigte minimale Stichprobengröße für B1 und 4. AF: Aufzucht- und Zuchtferkel; ZS: Zuchtsau; OF: Speichelprobe

Bereich	Seroprävalenz (%)	Stichproben- größe	Virusprävalenz (%)	Stichproben- größe
AF	67	6	36	9
ZS	36	9	1	95
OF	83	3	30	9

4.3.3. Speichelproben versus Serumproben

Insgesamt wurden 58 Speichelproben mittels PCR und ELISA Verfahren untersucht. Der Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente und Antikörper verlief in den Betrieben B2 und B3 negativ. Die Ergebnisse der gewonnenen Speichelproben aus den Betrieben 1 und 4 sind in Tabelle 15 aufgelistet. Insgesamt konnten in 17 Speichelproben Antikörper und in 6 Speichelproben virale RNA nachgewiesen werden. Im Anschluss der Analyse der Speichelproben mittels konventioneller PCR

4. Ergebnisse

wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Beide Nachweisverfahren konnten in 6 Proben virale RNA nachweisen. Die Anzahl an genomischen Kopien / ml sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Darstellung der qRT-PCR Ergebnisse der positiv getesteten Speichelproben aus den Betrieben 1 und 4.

Proben	Ct	Kopien / ml
1	35,98	$5,16 \times 10^3$
2	36,06	$4,85 \times 10^3$
3	37,67	$1,58 \times 10^3$
4	34,03	$2,00 \times 10^4$
5	39,30	$5,10 \times 10^2$
6	37,87	$1,38 \times 10^3$

Für den buchtenweisen Vergleich der Speichel- und Serumproben wurden in beiden positiven Betrieben 21 Buchten auf die Präsenz von PRRSV-spezifischen Genomfragmenten und Antikörper untersucht. Insgesamt konnten in 18 (Serumproben) bzw. 17 (Speichelproben) von 21 Buchten spezifische Antikörper gegen PRRSV nachgewiesen werden. Eine Speichelprobe zeigte ein falsch negatives Ergebnis (Tabelle 18).

Tabelle 18: Kreuztabelle für den Vergleich des Antikörpernachweises in Serum- und Speichelproben.

ELISA		Speichel	
		negativ	positiv
Serum	negativ	3	0
	positiv	1	17

Der buchtenweise Vergleich der Ergebnisse der Speichel- und Serumproben zeigte, dass 11 Serumproben und 6 Speichelproben PRRSV positiv waren. Insgesamt waren 6 Speichelproben falsch negativ und eine Probe falsch positiv.

4. Ergebnisse

Tabelle 19: Kreuztabellen für den Vergleich des Virusnachweises in Serum- und Speichelproben.

PCR		Speichel	
		negativ	positiv
Serum	negativ	9	1
	positiv	6	5

Anhand der erhobenen ELISA Ergebnisse konnte eine Sensitivität der Speichelproben von 94,4 % und eine Spezifität von 100 % ermittelt werden. Die verwendete PCR-Methode zeigte eine Sensitivität von 45,45 % und eine Spezifität von 90 %.

Der Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper in Serum- und Speichelproben zeigte eine annähernd vollständige und signifikante Übereinstimmung ($\kappa = 0,829$; $p < 0,001$; Abbildung 16). Der Nachweis von PRRSV-spezifischen Genomfragmenten im Serum in 11 Buchten und im Speichel in 6 Buchten positiv (Abbildung 16). Der Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente in den Serum- und Speichelproben zeigte eine ausreichende, aber nicht signifikante Übereinstimmung ($\kappa = 0,347$, $p > 0,05$).

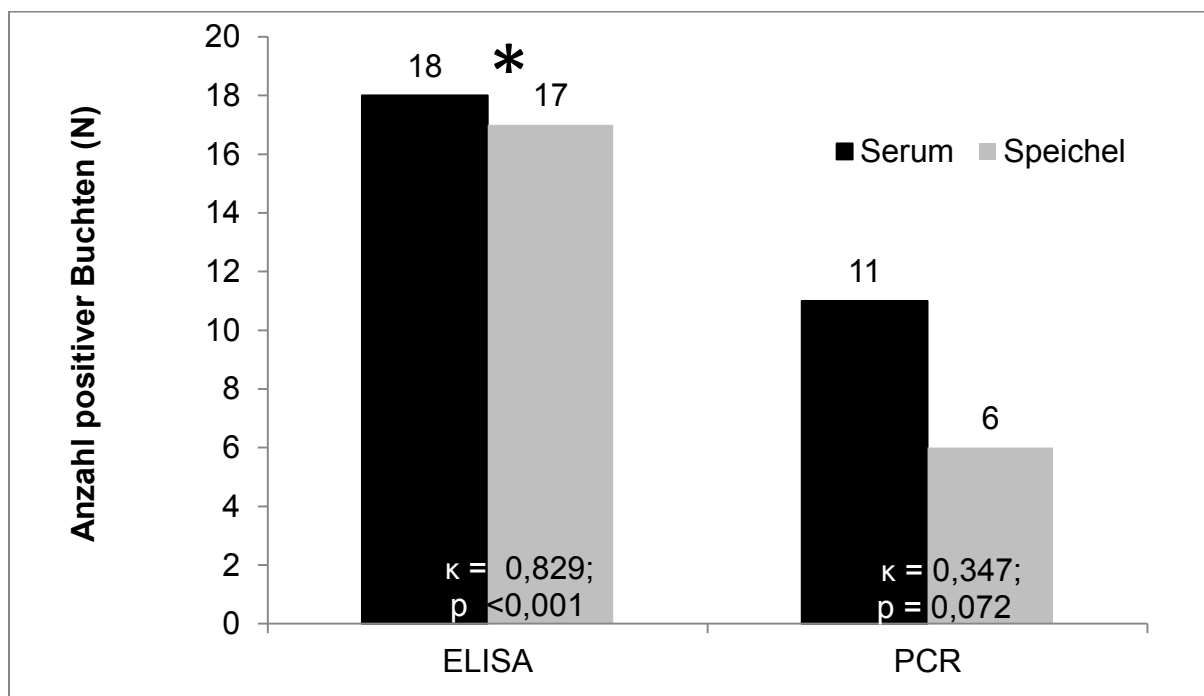


Abbildung 16: Anzahl der positiven Buchten; es wurden Speichel- und Serumproben verglichen; eine signifikante hervorragende Übereinstimmung im Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper (ELISA; $\kappa = 0,829$; $p < 0,001$), keine Übereinstimmung im Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente (PCR; $\kappa = 0,347$; $p = 0,75$)

4. Ergebnisse

Tabelle 20: Übersicht untersuchter Proben. PCR und ELISA positive Ergebnisse und die errechnete Virus- und Seroprävalenz betriebsweise aufgelistet

Betrieb	Altersgruppe	Anzahl untersuchter Proben (n)	Virusprävalenz		Seroprävalenz		PRRSV-Status
			PCR positiv	Errechnete Prävalenz (%)	ELISA positiv	Errechnete Prävalenz (%)	
1	Zuchtsauen	45	0	2	16	36	positiv
	Aufzucht- / Zuchtferkel	35	11	31	14	40	
2	Zuchtsauen	81	0	0	0	0	negativ
	Aufzucht- / Zuchtferkel	99	0	0	0	0	
3	Zuchtsauen	117	0	0	4	0,03	fraglich
	Aufzucht- / Zuchtferkel	52	0	0	0	0	
4	Zuchtsauen	95	4	0,4	35	37	positiv
	Aufzucht- / Zuchtferkel	15	6	40	14	93	

5. Diskussion

In dieser Studie wurde der Einsatz von Speichelproben zum Nachweis einer PRRSV-Infektion in Österreich überprüft. Ziel vorliegenden Studie war, das PRRSV in Serum- und Speichelproben nachzuweisen. Die Prävalenz des Erregers wurde in der Zuchtsauenherde, sowie bei Aufzucht- und Zuchtferkeln bestimmt. Anhand der berechneten Prävalenz wurden die Stichprobenanzahl für die Entnahme von Serumproben bei Zuchtsauen und Aufzucht- und Zuchtferkeln, sowie der Stichprobenumfang für die Entnahme der Speichelproben berechnet, um vorhandene Monitoringprogramme zu adaptieren.

Seit dem Auftreten in den späten 1980er Jahren hat sich PRRSV zu einem großen Problem in der Schweinehaltung entwickelt. Heute ist das Virus in den meisten schweineproduzierenden Ländern endemisch und die Bekämpfung des Erregers erweist sich als schwierig (ZIMMERMAN et al., 2012; POLSEN, 2012). Eine PRRSV-Infektion ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der Tageszunahmen, Lethargie und respiratorischen Symptomen bei wachsenden Schweinen, sowie durch Aborte und die Geburt lebensschwacher Ferkel bei Zuchtsauen (KLINGE et al., 2009; ZIMMERMAN et al., 2012; ROWLAND and MORRISON, 2012). Das PRRSV ist zudem ein immunsuppressives Virus und begünstigt daher vor allem bakteriell bedingte Sekundärinfektionen und beeinflusst somit negativ den Gesundheitszustand der Schweine (CHOI et al., 2003; ZIMMERMAN et al., 2012). Aufgrund dieser Eigenschaften ist das Virus verantwortlich für hohe wirtschaftliche Verluste (HOLTKAMP et al., 2012). Die PRRSV-Surveillance ist eine Schlüsselkomponente in der Vorbeugung und Kontrolle einer PRRSV-Infektion. Die Überwachung des PRRSV ist aber oft limitiert durch hohe Laborkosten, die eine ausreichende Stichprobenentnahme verhindert. Weitere Gründe für die lückenhafte und teilweise frustrierende Kontrolle des PRRSV sind unter anderem die unterschiedliche Prävalenz des Erregers in der Herde und eine hohe genetische Variabilität (DUINHOF et al., 2011; POLSEN, 2012; TOPLAK et al., 2012). Daher wurde in Österreich das bundeslandübergreifende Programm zur Überwachung des PRRS in österreichischen Herdebuchzuchtbetrieben durch den TGD gestartet. Die Stichprobengröße des TGD-Programms sieht eine Stichprobengröße von 14 Proben (4 Altsauen, 4 Jungsauen, 4 Läufer zwischen 30 und 45 kg und 2 Eber) pro Betrieb vor (ANNONYMUS, 2004). In Deutschland wurde 2011 ein Positionspapier zum

5. Diskussion

Thema Stichprobengröße für Monitoringprogramme publiziert (NATHUES et al., 2011b). Inhaltlich wurde die wissenschaftliche Meinung zur Stichprobengröße dargestellt. Als Conclusio wurde eine regelmäßige klinische Untersuchung im Abstand von vier Wochen empfohlen, sowie eine Untersuchung auf das Vorhandensein PRRSV-spezifischer Antikörper und Genomfragmente im zweimonatigem Abstand aus 15 Serumproben. Eine Studie von POLSON und JOARDAN (2002) zeigte, dass für den Nachweis einer PRRSV-Infektion nicht nur die Probenanzahl, sondern auch die Frequenz der Untersuchungen von entscheidender Bedeutung ist. Eine Erhöhung der Frequenz mit gleichzeitig geringer Probenanzahl steigert die Wahrscheinlichkeit, erkrankte Tiere zu detektieren.

In dieser Studie wurde die PCR- und ELISA-Methode zum Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente und Antikörper verwendet. Die in dieser Studie nachgewiesenen PRRSV-Genomfragmente konnten dem PRRSV Typ 1 zugeordnet werden. Das PRRSV Typ 1 ist in Österreich weit verbreitet, während das Typ 2 Virus nur in seltenen Fällen nachgewiesen werden konnte (INDIK et al., 2005).

Die vorliegende Studie zeigte, dass nur ein geringer Zusammenhang zwischen ELISA- und PCR-Methode bestand. Erklärungen für diese Ergebnisse ist die unterschiedliche Dauer des Nachweises der viralen RNA und PRRSV-spezifischen Antikörpern. Das Virus kann in der Regel bis zu 35 Tage nach der Infektion im Serum nachgewiesen werden (KLINGE et al., 2009). Im Gegensatz zur PCR-Diagnostik ist der indirekte Nachweis einer PRRSV-Infektion mittels PRRSV-spezifischer Antikörper über eine längere Zeitperiode möglich (FANO et al., 2007). PRRSV-spezifische Antikörper können zwischen neun Tage bis zu 12 Monaten nach der Infektion nachgewiesen werden (ROBERTS und ALMOND, 2003). Der Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente hat den Vorteil, dass eine frühe Infektion nachgewiesen werden kann und keine Interferenz mit maternalen Antikörpern besteht. Aufgrund des längeren Nachweises PRRSV-spezifischer Antikörper im Serum, ist der Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper für Überwachungsprogramme des PRRSV-Status einer Schweinepopulation geeignet. Der Nachweis mittels PCR liefert jedoch eine genauere Aussage über die aktuelle Verbreitung innerhalb einer Herde (DUINHOF et al., 2011) und ist für eventuelle Sanierungs- oder Eradikationskonzepte von entscheidender Bedeutung (CORZO et al., 2010). PRRSV-Infektionen müssen nicht in allen Tiergruppen gleichmäßig verbreitet sein. Sie

5. Diskussion

können sich auf einzelne Altersgruppen in einem Betrieb beschränken (DEE und JOO, 1994). Sauen haben aufgrund der vertikalen Übertragung des PRRSV einen besonderen Einfluss auf die Verbreitung des PRRSV in der Herde und haben daher bei der Überwachung des PRRSV-Status besondere Bedeutung (ROBERTS, 2003; KARNIYCHUK und NAUWYNCK, 2009). Die Untersuchung der Aufzuchtferkel ist eine geeignete Methode des PRRSV-Nachweises in einer Herde mit niedriger Prävalenz (ROBERTS, 2003). Die erhobenen Befunde zeigten eine heterogene Verteilung der viralen RNA. So konnte in der Zuchtsauenherde in 140 Serumproben nur vier PRRSV-positive Proben nachgewiesen werden. In der Aufzucht- und Zuchtferkelherde hingegen waren insgesamt 17 von 50 Serumproben PRRSV-positiv. Ähnliche Resultate zeigte eine Studie von DUINHOF et al. (2011). Der Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente war in der Aufzucht- und Zuchtferkelherde signifikant höher als in der Zuchtsauenherde (DUINHOF et al., 2011). Eine beschriebene Interferenz mit maternalen Antikörpern kann in dieser Studie jedoch nicht ausgeschlossen werden (ZIMMERMAN et al., 2012). In einer Studie von DUINHOF et al. (2011) wurde diese Unterteilung vorgenommen und eine mögliche Interferenz der maternalen Antikörper konnte ausgeschlossen werden. Die Studie zeigte, dass für den PRRSV-Nachweis Ferkel im Alter zwischen 9. und 12. Lebenswoche untersucht werden sollten. Die untersuchten Schweine dieser Studie waren zwischen 7 und 16 Wochen alt. Im Mittel lag die Seroprävalenz in der Aufzucht bei 67 % (40-97 %) und in der Zuchtsauenherde bei 36 % (36-37 %). Die Mittelwerte der Virusprävalenz lagen in der Ferkel- und Zuchtferkelherde bei 36 % (31-40 %) und in der Zuchtsauenherde bei 1 % (0,4-2 %). Die daraus ermittelte Stichprobengröße zeigte, dass 3-6 Proben in der Aufzucht und Zuchtferkelherde bzw. 9-95 Proben in der Zuchtsauenherde untersucht werden müssen, damit mindestens eine Probe positiv ist. Ähnliche Resultate zeigten auch Studien von DUINHOF et al. (2011), die eine Stichprobengröße von 6-9 Proben bei Aufzuchtferkeln empfohlen haben. Eine andere Studie von HOLTKMAP et al. (2012) besagte, dass für die Überwachung des PRRSV-Status 30 Absetzferkel untersucht werden sollten. In Betrachtung des gegenwertig durchgeführten TGD-Überwachungsprogramms zum Nachweis des PRRSV in Schweinezuchtbetrieben muss die Stichprobenanzahl diskutiert werden. Das Überwachungsprogramm gibt eine einheitliche Stichprobengröße von 14 Proben an (ANNONYMUS 2004). Die Untersuchung verschiedener Altersklassen ist aufgrund der unterschiedlichen Verbreitung innerhalb

5. Diskussion

der Herde sinnvoll (ROBERTS, 2003). Das Überwachungsprogramm richtet sich jedoch nicht nach der Anzahl der gehaltenen Schweine am Betrieb. Das Risiko, falsch negative Befunde zu erhalten ist bei dieser Stichprobengröße relativ hoch.

Seit 2008 werden in den USA Speichelproben zum Nachweis einer PRRSV-Infektion genutzt. Im Jahr 2011 wurden 32.500 Speichelproben und 2012 mehr als 52.000 Speichelproben von Schweinen in den USA untersucht (OLSEN et al., 2013). In Europa werden Speichelproben eher selten eingesetzt (SCHMOLL et al., 2012; SATTLER et al., 2013). Ein Grund für den mäßigen Einsatz von Speichelproben ist, dass vorhandene Nachweisverfahren, die in der Routinediagnostik eingesetzt werden, an das Medium Speichel adaptiert werden müssen (CHITTICK et al., 2011; KITTAWORNAT et al., 2012; DECORTE et al., 2013). Die vorliegende Studie zeigte, dass PRRSV über 72 Stunden bei einer Lagerungstemperatur von -20 °C, 4 °C und 10 °C nachweisbar ist. Es konnte eine Reduktion der genomischen Kopien / ml im zeitlichen Verlauf festgestellt werden. Am stabilsten war die PRRSV-RNA bei einer Lagerung von 4-10 °C. Verschiedene Studien zeigten ähnliche Ergebnisse (PRICKETT et al., 2010; DECORTE et al., 2013). Auch diese Studien haben eine Lagerung bei 4-10 °C empfohlen. Aufgrund einer niedrigeren Viruskonzentration im Speichel als z.B. im Serum, wurden dem Speichel Zusätze beigefügt, um den Nachweis von PRRSV-spezifischen Genomfragmenten zu verbessern (PRICKETT et al., 2010). Die in dieser Studie verwendeten Zusätze (EDTA und SDS, Chlorhexidin und Proteinase K) zeigten jedoch keine Verbesserung des PRRSV-Nachweises in Speichelproben. Der Zusatz von Proteinase K führt sogar zu einem Verlust viraler Kopien. PRICKETT et al. (2010) konnten ebenfalls keine Verbesserung durch Zusätze (Chlorhexidine und Isothiazolinone) nachweisen. DECORTE et al. (2013) schlussfolgerten in ihrer Studie, dass der Zusatz von RNA-Stabilisatoren (Orange RNA) die virale RNA im Speichel über sieben Tage konservieren konnten. Einige Studien zeigten, dass PRRSV-spezifische Genomfragmente mit mittelmäßigem Erfolg im Vergleich zu Serumproben nachgewiesen werden konnten (PRICKETT et al., 2008b, CHITTICK et al., 2011; SCHMOLL et al., 2012). Andere Studien demonstrierten wiederum vergleichbare Ergebnisse zwischen Serum- und Speichelproben (KITTAWORNAT et al., 2010; LINHARES et al., 2012). Adaptierte ELISA-Tests zum Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper wurden entwickelt und zeigten vergleichbare Ergebnisse zwischen Serum- und Speichelproben (KITTAWORNAT et al., 2012). Im buchtenweisen Vergleich der

5. Diskussion

Speichel- und Serumproben wurde in 18 Buchten im Serum und in 17 Speichelproben Antikörper gegen PRRSV nachgewiesen. In 11 Buchten im Serum und in 6 Speichelproben konnten PRRSV-spezifische Genomfragmente nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie konnte eine annähernd vollständige und signifikante Übereinstimmung im Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper zwischen Serum- und Speichelproben dargestellt werden. Der Nachweis viraler RNA erbrachte eine ausreichende, aber nicht signifikante Übereinstimmung. Gründe für die ausreichende Übereinstimmung zwischen Serum- und Speichelproben wurden in der Literatur diskutiert. Eine Studie von PRICKETT et al. (2008a) schlussfolgerten, dass im Speichel weniger PRRSV ausgeschieden wird. CHITTICK et al. (2011) kamen zu dem Schluss, dass inhibierende Faktoren im Speichel den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente beeinflussen. Anhand der ermittelten Sero- und Virusprävalenz wurde in dieser Studie die minimale Stichprobengröße ermittelt. Im Mittel müssen weniger Speichelproben (3) als Serumproben (6) entnommen werden, damit mindestens ein PRRSV-Antikörper positives Schwein detektiert werden kann. Im Durchschnitt sollten gleich viele Serum- und Speichelproben (9) entnommen werden, damit ein Virus positives Schwein nachgewiesen werden kann. Die vorliegende Studie zeigte im Gegensatz zu anderen in Europa durchgeführten Studien, dass sich Speichelproben für die Überwachung des PRRSV-Status gut eignen (SCHMOLL et al., 2012; SATTLER et al., 2013). Neben der Wahl eines geeigneten Extraktions- und PCR-Protokolls sind die Strickpräsentation und die damit verbundene Entnahme des Speichels von großer Bedeutung. Die Wahl des Materials aus dem der Strick gefertigt wird, ist entscheidend für den Nachweis des PRRSV im Speichel. Eine Studie von OLSEN et al. (2012) fand heraus, dass das verwendete Material absorbierend und biologisch abbaubar sein sollte. Am besten eignet sich die Entnahme von Speichel mittels unbehandelter Baumwolle (OLSEN et al., 2012). In der vorliegenden Studie konnte kein deutlicher Unterschied zwischen eines kommerziell erhältlichen Speichelprobenentnahmesystems (TEGO oral fluid kit, ILT Animal healthcare, Melbourne, Australien) und eines handelsüblichen Baumwollstrickes (Sankt Josef Werkstatt, Dorfen, Deutschland) festgestellt werden.

Die buchtenweise Entnahme von Speichelproben stellt eine schonende und effektive Methode der Probengewinnung dar. Eine 30-minütige Expositionsdauer ist ausreichend, um eine große Anzahl an Schweinen zu beproben. Die buchtenweise Speichelprobenentnahme nutzt das Normalverhalten der Schweine aus, welches die

5. Diskussion

orale Exploration von Materialien beinhaltet (WEERD et al., 2006). Deswegen sollte das verwendete Material flexibel, robust und kaubar sein (FEDDES und FRASER, 1994; ZONDERLAND et al., 2003; KITTAWORNAT und ZIMMERMAN, 2011). Die Anzahl der Schweine, die am Kastrick kauen ist abhängig von mehreren Faktoren. Dazu gehören unter anderem die Ausstattung der Buchten, die Gruppengröße, das Alter der Tiere, die soziale Struktur der Herde und die Art der Strickpräsentation (CRAIG, 1986; TURNER et al., 2000; TURNER et al., 2003; SCOTT et al., 2007; DOCKING et al., 2008). In der vorliegenden Studie haben im Mittel 75,9 und 79,4 % der Schweine in der 7. / 8. und 12. Lebenswoche am Strick gekaut. Des Weiteren zeigte die Studie, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an Schweinen, die am Stick gekaut haben zwischen der Herdengröße bestand. Die höchste Tier-Strick-Interaktion war mit durchschnittlich 96,5 % in der 7. / 8. Lebenswoche mit einer Buchtengröße von 19 Tieren pro Bucht. Auch SEDDON et al. (2012) schlussfolgerten, dass die Strickpräsentation in einer Herdengröße von 17-24 eine effektive Methode der Speichelgewinnung für diagnostische Tests ist. Die in der Literatur beschriebene Expositionsdauer des Kastrickes schwankt zwischen 10-60 Minuten (PRICKETT et al., 2008a; SEDDON et al., 2012; MUR et al., 2013). Die meisten Studien, auch diese Studie, verwendeten jedoch eine 30-minütige Strickexposition nach PRICKETT et al. (2008a). SEDDON et al. (2012) zeigten in ihrer Studie, dass ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Schweinen, die am Stick gekaut haben bis zur 45. Minute bestanden hat, im Anschluss konnten kein signifikanter Anstieg bemerkt werden. Des Weiteren besagt die Studie, dass in den ersten 15 Minuten die meisten Tiere am Stick gekaut haben (SEDDON et al., 2012). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in der vorliegenden Studie erbracht werden. In dieser Studie wurde ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Schweinen, die am Strick gekaut haben bis zur 10. bzw. 20. Minute festgestellt.

Die gewonnene Menge an Speichel schwankte im Mittel zwischen 2,9 und 12,3 ml. Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der gewonnenen Speichelmenge. Eine Studie von JABLONSKI et al. (2011) konnten 2,6-1,7 ml aus den Speichelproben gewinnen. SEDDON et al. (2012) haben 12,6-26,8 ml Speichel nach einer Stunde der Exposition gewinnen können. Die Menge des gewonnenen Speichels ist abhängig vom Alter der Tiere, der Herdengröße und der Umgebungstemperatur (GEORGIEV, 1972; BREVES, 2010; JABLONSKI et al., 2011). Die Studie zeigte auch, dass genug Speichel pro Bucht für den Nachweis für mehrere

5. Diskussion

diagnostische Verfahren vorhanden war. In dieser Studie wurden pro Bucht 140 µl für den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente und 150 µl für den Nachweis von Antikörper gegen PRRSV verwendet.

6. Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie zeigt, dass sich die Sero- und Virusprävalenz innerhalb einer Schweineherde zwischen den Altersgruppen (Zuchtsauen und Ferkelaufzucht) unterscheidet. Die Sero- und Virusprävalenz variiert zwischen 36 % und 93 % bzw. zwischen 0,4 % und 40 % in der Zuchtsauenherde und der Ferkelaufzucht. Die erhobenen Befunde lassen darauf schließen, dass in der Ferkelaufzucht eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, PRRSV positive Schweine zu identifizieren. Eine Stichprobengröße von 9 Serumproben in der Ferkelaufzucht sollte daher mindestens entnommen werden. Die buchtenweise Speichelprobenentnahme ist eine gute Alternative für den Nachweis einer PRRSV-Infektion und eignet sich für die Überwachung des Gesundheitsstatus einer Herde. Durch die buchtenweise Entnahme von Speichel kann eine größere Anzahl an Schweinen mit einer Probe untersucht werden. Dadurch können Laborkosten gesenkt werden. Ein weiterer wichtiger Vorteil der Speichelproben gegenüber den Serumproben ist, dass der Stress und die Belastung der Tiere gesenkt werden, der durch die Blutprobenentnahmen verursacht wird. Des Weiteren ist die Speichelprobenentnahme eine zeiteffektive Methode, den PRRSV-Status einer Schweineherde zu bestimmen, da in 30 Minuten 75,9-79,4 % der Schweine mit einer Probe untersucht werden können.

7. Zusammenfassung

Das porcine reproduktive und respiratorische Syndrom Virus (PRRSV) ist verantwortlich für Aborte, Totgeburten und die Geburt lebensschwacher Ferkel sowie für respiratorische Symptome und einer verminderten Tageszunahme bei wachsenden Schweinen. Der Verdacht einer PRRSV-Infektion wird anhand der Anamnese, klinischen Symptome und pathomorphologischen und -histologischen Veränderungen sowie durch den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente und Antikörper gestellt. In der Routinediagnostik wird eine PRRSV-Infektion anhand des Nachweises von PRRSV-spezifischen Antikörpern und Genomfragmenten mittels ELISA und PCR aus Serum- und Organproben nachgewiesen. Der Nachweis einer PRRSV-Infektion ist jedoch in vielen Fällen falsch negativ. Gründe für den fehlenden Nachweis einer PRRSV-Infektion sind eine hohe genetische Variabilität, unterschiedliche Sero- und Virusprävalenz in den einzelnen schweinehaltenden Betrieben sowie eine uneinheitliche Verbreitung des Virus in den verschiedenen Altersstufen. Aus diesem Grund wurde in den USA der Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente und Antikörper aus Speichelproben der Schweine entwickelt. Die buchtenweise Entnahme von Speichelproben stellt eine kosten- und zeiteffektive sowie nichtinvasive Methode für den Nachweis einer PRRSV-Infektion dar. Ziel dieser Arbeit war, das PRRSV in Serum- und Speichelproben von Schweinen aus vier steirischen Betrieben nachzuweisen und anhand der erhobenen Ergebnisse die Prävalenz des Erregers in der Zuchtsauenherde sowie bei Aufzucht- und Zuchtferkel zu bestimmen, um vorhandene Monitoringprogramme zu adaptieren.

In der vorliegenden Studie wurde der Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente und Antikörper in Serum- und Speichelproben untersucht. Für die Adaptation des molekularbiologischen Nachweises PRRSV-spezifischer Genomfragmente wurde PRRSV-negativer Speichel mittels zwei Entnahmesystemen (TEGO Oral Fluid Kit und ein Baumwollstrick) gewonnen und Virus zugesetzt. Der Einfluss von Lagerungszeit und -temperatur des Speichels wurde überprüft. Im Rahmen der Überwachung des PRRSV-Status durch den Steirischen Tiergesundheitsdienst wurden insgesamt 539 Serumproben und 58 Speichelproben aus vier steirischen schweinehaltenden Betrieben auf das Vorhandensein PRRSV-spezifischer Genomfragmente und Antikörper untersucht.

7. Zusammenfassung

Es konnten über 72 Stunden PRRSV-spezifische Genomfragmente im Speichel nachgewiesen werden. Die höchste Anzahl genomischer Kopien / ml konnten bei einer Lagerungstemperatur von 4-10°C nachgewiesen werden. Nach einer 30-minütigen Strickexposition haben im Mittel 75,9-79,4 % der Tiere in der 7. / 8. Lebenswoche bzw. 12. Lebenswoche am Stick gekaut. Die statistische Auswertung der Anzahl der Schweine, die am Stick gekaut haben, zeigte dass ein signifikanter Anstieg der am Strick kauenden Schweine bis zur 10. bzw. 20. Minute vermerkt werden konnte. Nach dieser Zeit konnte kein signifikanter Anstieg festgestellt werden. PRRSV-spezifische Genomfragmente und Antikörper konnten in den Serumproben der Schweine aus Betrieb 1 und 4 nachgewiesen werden. Es konnte ein geringfügiger aber nicht signifikanter Zusammenhang zwischen ELISA und PCR-positiven Ergebnissen ermittelt werden ($\kappa = 0,3$; $p \geq 0,05$). Die untersuchten Serum- und Speichelproben hatten eine annähernd vollständige und signifikante Übereinstimmung ($\kappa = 0,829$; $p < 0,001$) im Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper. Insgesamt konnten in 11 Buchten PRRSV-spezifische Genomfragmente im Serum und in 6 Buchten im Speichel nachgewiesen werden. Der Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente in den Serum- und Speichelproben zeigte eine ausreichende, aber nicht signifikante Übereinstimmung ($\kappa = 0,347$, $p > 0,05$). Die mittlere Seroprävalenz lag bei 36 % (36-37 %) in der Zuchtsauenherde und 67 % (40-94 %) in der Aufzucht- und Zuchtferkelherde. Die durchschnittliche Virusprävalenz betrug 1 % (0,4-2 %) in der Zuchtsauenherde und 36 % (32-40 %) in der Aufzucht- und Zuchtferkelherde. Die mittlere Virusprävalenz der gewonnenen Speichelproben lag bei 30 % (26-34 %) und die Mittlere Seroprävalenz lag bei 83 % (76-90 %). Anhand der errechneten Prävalenz konnten die Stichprobengröße ermittelt werden. Die ideale Stichprobengröße für den Nachweis viraler RNA lag in der Zuchtsauenherde bei 95 Serumproben, in der Aufzucht- und Zuchtferkelherde bei 9 Serum-Speichelproben. Für den Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper sollte ein Probenumfang von 9 Proben in der Zuchtsauenherde, 6 Proben in der Aufzucht- und Zuchtferkelherde und 9 Speichelproben genommen werden.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass PRRSV eine höhere Sero- und Virusprävalenz in der Aufzucht- und Zuchtferkelherde hat. Die Stichprobengröße ist altersabhängig und variiert zwischen 95 Proben für den Nachweis viraler RNA in der Zuchtsauenherde und 3 zum Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper in Speichelproben. Der Einsatz von Speichelproben zum

7. Zusammenfassung

Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper und Genomfragmente stellt eine sinnvolle Ergänzung des Nachweises einer PRRSV-Infektion dar. Vorhandene Monitoringprogramme können durch den Einsatz von Speichelproben beim Schwein ergänzt werden.

8. Summary

8. Summary

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is one of the major pathogens in swine production and causes huge economic losses. PRRSV causes reproductive failure in sows and respiratory disorders in weaning and fattening pigs. Therefore surveillance of PRRSV is an important tool to reduce the economic impact of PRRSV and to control this virus. For the detection of PRRSV serum and tissue samples are tested by using ELISA and PCR methods. The detection of PRRSV is often false negative. Reasons for these false negative Results are the high genetic differences in the PRRSV genome and differences of the PRRSV prevalence in the different age groups. Therefore American scientists have developed methods for the detection of PRRSV in oral fluid samples routinely. Pen-based oral fluid sampling has proven to be an efficient method for the surveillance of PRRSV in swine herds.

The aim of this study was to evaluate the ability of serum and oral fluid samples for the ability detection of anti-PRRSV antibodies and viral RNA in swine populations.

In this study PRRSV was added to virus negative oral fluid to adapt the routinely used extraction protocol to oral fluid samples. Two different methods of collecting oral fluid samples were compared (TEGO Oral fluid Kit and a cotton rope). The mixture of oral fluid and PRRSV was stored for 72 hours at -20, 4, and 10 °C. Over the time course genomic copies were extracted using a viral isolation kit and detected by qRT-PCR. Biodegradable cotton ropes were used for the pen-based oral fluid sampling. To test the efficacy of rope presenting, a single cotton rope was presented for 30 minutes and the number of pigs chewing on the rope was counted every minute. With these preliminary data 539 blood and 58 oral fluid samples were taken from four Styrian swine farms. Serum and oral fluid samples were tested for the presence of antibodies against PRRSV and PRRSV-RNA.

In this study two farms had positive results for both the presence of PRRSV antibodies and viral RNA. One farm was negative in both assays and one farm had four positive ELISA results in sows. In the two positive farms virus prevalence was estimated at 0.4-2 % in the sow herd. In the growing pig / breeding stock unit virus prevalence ranged from 30-42 %. The sero-prevalence in the sow herd and growing pig / breeding stock unit ranged from 34-37 % and 38-94 %, respectively. ELISA results had an almost perfect and significant agreement between pen-based serum

8. Summary

and oral fluid sampling ($\kappa = 0.829$; $p < 0.001$). Pen-based serum and oral fluid samples had a fair and not significant agreement between both PCR based assays ($\kappa = 0.347$; $p = 0.75$). The estimated sample size varied from 95 samples for the detection of PRRSV-RNA in sows to 3 samples for the detection of antibodies against PRRSV in oral samples.

The results of the present study indicate that the sample size for the testing of PRRSV depends on age. The lowest sample size is needed in the growing pig unit. Using oral fluid for the detection of antibodies against PRRSV and viral RNA is a good contribution for PRRSV surveillance in swine populations.

9. Literaturverzeichnis

ALBINA, E., LEFORBAN, Y., BARON, T., PLANA DURAN, J.P., VANNIER, P. (1992): An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Annales de recherches veterinaires. Annals of Veterinary Research 23, 167-176.

ANNONYMUS (2004): Programm zur Überwachung von PRRS in österreichischen Herdebuchzuchtbetrieben. Amtliche Vetrinärnachrichten 8, 78-98.

BADAOUI, B., GRANDE, R., CALZA, S., CECERE, M., LUINI, M., STELLA, A., BOTTI, S. (2013): Impact of genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on infectivity and pig growth. BMC Veterinary Research 9, doi:10.1186/1746-6148-9-58

BALKA, G., HORNYAK, A., BALINT, A., BENYEDA, Z., RUSVAI, M. (2009): Development of a one-step real-time quantitative PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Journal of Virological Methods 158, 41-45.

BALKA, G., HORNYAK, A., BALINT, A., KISS, I., KECSKEMETI, S., BAKONYI, T., RUSVAI, M. (2008): Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds. Veterinary Microbiology 127, 128-135.

BAUMGARTNER, W. (2009): Probenahme, Laboruntersuchungen und invasive diagnostische Maßnahmen. In: Baumgartner W.: Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere. 7. Aufl., Parey, Stuttgart, S. 432-494.

BAUTISTA, E.M., GOYAL, S.M., YOON, I.J., JOO, H.S., COLLINS, J.E. (1993): Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 5, 163-165.

9. Literaturverzeichnis

BLAKE, J.W., TOBIN, T., (1986): Testing for drugs in horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 6, 93–97.

BØTNER, A., NIELSEN, J., BILLE-HANSEN, V. (1994): Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. *Veterinary Microbiology* 40, 351-360.

BREVES, G (2010): Nahrungsaufnahme und Speichelsekretion. In: Engelhardt W. und Breves G.: *Physiologie der Haustiere*. 3. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, S. 332-338.

CALVERT, J.G., SLADE, D.E., SHIELDS, S.L., JOLIE, R., MANNAN, R.M., ANKENBAUER, R.G., WELCH, S.W. (2007): CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Journal of Virology* 81, 7371-7379.

CANNON, R.M., ROE, R.T. (1982): *Livestock disease surveys: A field manual for veterinarians*. Australian Government Public Service, Canberra, Australia.

CAVANAGH, D. (1997): Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Archives of Virology* 142, 629-633.

CHIAPPIN, S., ANTONELLI, G., GATTI, R., DE PALO, E.F. (2007): Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta* 383, 30-40.

CHITTICK, W.A., STENSLAND, W.R., PRICKETT, J.R., STRAIT, E.L., HARMON, K., YOON, K., WANG, C., ZIMMERMAN, J.J. (2011): Comparison of RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine oral fluid specimens. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 248-253.

CHOI, Y.K., GOYAL, S.M., JOO, H.S. (2003): Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *The Canadian Veterinary Journal* 44, 735-737.

9. Literaturverzeichnis

CHRISTIANSON, W.T., CHOI, C.S., COLLINS, J.E., MOLITOR, T.W., MORRISON, R.B., JOO, H.S. (1993): Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Canadian Journal of Veterinary Research* 57, 262-268.

CHRISTOPHER-HENNINGS, J., NELSON, E.A., HINES, R.J., NELSON, J.K., SWENSON, S.L., ZIMMERMAN, J.J., CHASE, C.L., YAEGER, M.J., BENFIELD, D.A. (1995): Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 7, 456-464.

COLEMAN, R., APPLEMAN, M. (1953): Antibodies of Syphilis in Saliva and Serum. *Journal of Dental Research* 32, 294-297.

COLLINS, J.E., BENFIELD, D.A., CHRISTIANSON, W.T., HARRIS, L., HENNINGS, J.C., SHAW, D.P., GOYAL, S.M., MCCULLOUGH, S., MORRISON, R.B., JOO, H.S. (1992): Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4, 117-126.

CORTHIER, G. (1976): Swine fever: influence of passive immunity on pig immune response following vaccination with a live virus vaccine (Thiverval strain). *Annales de recherches veterinaires. Annals of Veterinary Research* 7, 361-372.

CORZO, C.A., MONDACA, E., WAYNE, S., TORREMORELL, M., DEE, S., DAVIES, P., MORRISON, R.B. (2011): Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research* 154, 185-192.

COSTA, G., OLIVEIRA, S., TORRISON, J. (2012): Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in oral-fluid samples obtained from experimentally infected pigs. *Journal of Swine Health and Production* 20, 78-81.

COSTERS, S., LEFEBVRE, D.J., DELPUTTE, P.L., NAUWYNCK, H.J. (2008): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages. *Archives of Virology* 153, 1453-1465.

9. Literaturverzeichnis

CRAIG, J.V. (1986): Measuring social behavior: social dominance. *Journal of Animal Science* 62, 1120-1129.

DAY, D., BAYSINGER, A., HARTSOOK, G. (2011): PRRS diagnostics: Correlation of serum, tonsil scrapings, and oral fluids in growing gilts with natural exposure. *Proceedings AASV Annual meeting: Evidence-based practice: How do we get there*, Phoenix, USA, 81-82.

DE JONG, I.C., PRELLE, I.T., VAN DE BURGWAL, J.A., LAMBOOIJ, E., KORTE, S.M., BLOKHUIS, H.J., KOOLHAAS, J.M. (2000): Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiology & Behavior* 68, 571-578.

DEA, S., GAGNON, C., MARDASSI, H., PIRZADEH, B., ROGAN, D. (2000): Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archives of Virology* 145, 659-688.

DECORTE, I., VAN DER STEDE, Y., NAUWYNCK, H., DE REGGE, N., CAY, A.B. (2013): Effect of saliva stabilisers on detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid by quantitative reverse transcriptase real-time PCR. *Veterinary Journal*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.02.001>

DEE, S., DEEN, J., PIJOAN, C. (2006): Evaluation of an industry-based sanitation protocol for full-size transport vehicles contaminated with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Swine Health and Production* 14, 307-311.

DEE, S., CANO, J.P., SPRONK, G., REICKS, D., RUEN, P., PITKIN, A., POLSON, D. (2012): Evaluation of the Long-Term Effect of Air Filtration on the Occurrence of New PRRSV Infections in Large Breeding Herds in Swine-Dense Regions. *Viruses* 4, 654-662.

DEE, S.A., JOO, H.S. (1994): Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. *Veterinary Record* 135, 6-9.

9. Literaturverzeichnis

DETMER, S.E., PATNAYAK, D.P., JIANG, Y., GRAMER, M.R., GOYAL, S.M. (2011): Detection of Influenza A virus in porcine oral fluid samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 241-247.

DOCKING, C.M., VAN DE WEERD, H.A., DAY, J., EDWARDS, S.A. (2008): The influence of age on the use of potential enrichment objects and synchronisation of behaviour of pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 110, 244-257.

DOKLAND, T. (2010): The structural biology of PRRSV. *Virus Research* 154, 86-97.

DROBITCH, R.K., SVENSSON, C.K. (1992): Therapeutic drug monitoring in saliva. *Clinical Pharmacokinetics* 23, 365-379.

DUINHOF, T., VAN SCHAIK, G., VAN ESCH, E., WELLENBERG, G. (2011): Detection of PRRSV circulation in herds without clinical signs of PRRS: Comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size. *Veterinary Microbiology* 150, 180-184.

DUNCAN, A.W., MAGGI, R.G., BREITSCHWERDT, E.B. (2007): Bartonella DNA in dog saliva. *Emerging Infectious Diseases* 13, 1948-1950.

EGLI, C., THÜR, B., LIU, L., HOFMANN, M.A. (2001): Quantitative TaqMan[®] RT-PCR for the detection and differentiation of European and North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virological Methods* 98, 63-75.

FANGMAN, T.J., KLEIBOEKER, S.B., COLEMAN, M. (2007): Tonsillar crypt exudate to evaluate shedding and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus after inoculation with live field virus or vaccination with modified live virus vaccine. *Journal of Swine Health and Production* 15, 219-223.

FANO, E., PIJOAN, C., DEE, S. (2007): Infection dynamics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous-flow population of pigs also infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Record* 161, 515-520.

FEDDES, J., FRASER, D. (1994): Non-nutritive chewing by pigs: implications for tail-biting and behavioral enrichment. *Transactions of the ASABE* 37, 947-950.

9. Literaturverzeichnis

GEORGIEV, S. (1972): Wirkungen höher Umgebungstemperaturen auf den Wasser- und Elektrolythaushalt des Schweines in verschiedenen Wachstumsstadien. *International Journal of Biometeorology* 16, 145-154.

GIMÉNEZ-LIROLA, L.G., XIAO, C., ZAVALA, M., HALBUR, P.G., OPRIESSNIG, T. (2012): Improving ante mortem diagnosis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid, and antibody detection. *Journal of microbiological methods*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.11.014>

GOMES-KELLER, M.A., TANDON, R., GÖNCZI, E., MELI, M.L., HOFMANN-LEHMANN, R., LUTZ, H. (2006): Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Veterinary Microbiology* 112, 11-21.

GRAAGE, R. (2011): PRRSV Challenge nach Impfung mit heterologem Genotyp. Diplomarbeit, Vet. Med. Univ. Wien, pp. 41.

GUTIERREZ, A., CERON, J., FUENTES, P., MONTES, A., MARTINEZ-SUBIELA, S. (2012a): Longitudinal analysis of acute-phase proteins in saliva in pig farms with different health status. *Animal* 6, 321-326.

GUTIÉRREZ, A., ESCRIBANO, D., FUENTES, M., CERÓN, J. (2012b): Circadian pattern of acute phase proteins in the saliva of growing pigs. *The Veterinary Journal*, 196, 167-170.

GUTIÉRREZ, A., NÖBAUER, K., SOLER, L., RAZZAZI-FAZELI, E., GEMEINER, M., CERÓN, J., MILLER, I. (2012c): Detection of potential markers for systemic disease in saliva of pigs by proteomics: A pilot study. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 151, 73-82.

GUTIÉRREZ, A., MILLER, I., HUMMEL, K., NÖBAUER, K., MARTINEZ-SUBIELA, S., RAZZAZI-FAZELI, E., GEMEINER, M., CERÓN, J. (2011): Proteomic analysis of porcine saliva. *The Veterinary Journal* 187, 356-362.

HAECKEL, R., HANECKE, P. (1993): The application of saliva, sweat and tear fluid for diagnostic purposes. *Annales de Biologie Clinique* 51, 903-910.

9. Literaturverzeichnis

HALBUR, P.G., ANDREWS, J.J., HUFFMAN, E.L., PAUL, P.S., MENG, X., NIYO, Y. (1994): Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6, 254-257.

HEINRITZI, K. (2006): Laboruntersuchung. In: Heinritzi K., Gindele H.R., Reiner G. und Schnurrbusch U.: *In Schweinekrankheiten*. 1. Aufl., Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 35-40.

HITE, D.L., ROTOLO, M., OLSEN, C., WANG, C., PRICKETT, J.R., KITTAWORNARAT, A., PANYASING, Y., MAIN, R., RADEMACHER, C., HOOGLAND, M, ZIMMERMAN, J.J. (2012): Pig behavior and the contribution of individual pigs to pen-based oral fluid samples. *Proceedings 22nd International Pig Veterinary Society Congress*, Jeju, Südkorea, 361,

HOLTKAMP, D.J., KLIEBENSTEIN, J.B., ZIMMERMAN, J.J., NEUMANN, E., ROTTO, H., YODER, T.K., WANG, C., YESKE, P., MOWRER, C.L., HALEY, C. (2011): Economic impact of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus on US pork producers. *Animal Industry Report* 658, 3-8.

INDIK, S., SCHMOLL, F., SIPOS, W., KLEIN, D. (2005): Genetic variability of PRRS virus in Austria: consequences for molecular diagnostics and viral quantification. *Veterinary Microbiology* 107, 171-178.

JABLONSKI, A., STRWA, M., STADEJEK, T. (2011): Impact of selected parameters of Efficacy of pen based oral fluid collection from pigs. *Proceedings: 6th International symposium on emerging and re-emerging pig diseases*, Barcelona, Spanien, 59.

JUSKO, W.J., MILSAP, R.L. (1993): Pharmacokinetic Principles of Drug Distribution in Salivaa. *Annals of the New York Academy of Sciences* 694, 36-47.

KANG, I., HA, Y., KIM, D., OH, Y., CHO, K., LEE, B., LIM, J., KIM, S., KWON, B., CHAE, C. (2010): Localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary glands of experimentally infected sows. *Research in Veterinary Science* 88, 304-306.

9. Literaturverzeichnis

KARNIYCHUK, U., GELDHOF, M., VANHEE, M., VAN DOORSSELAERE, J., SAVELEVA, T., NAUWYNCK, H. (2010): Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Veterinary Research* 6, 30

KARNIYCHUK, U.U., SAHA, D., GELDHOF, M., VANHEE, M., CORNILLIE, P., VAN DEN BROECK, W., NAUWYNCK, H.J. (2011): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes apoptosis during its replication in fetal implantation sites. *Microbial Pathogenesis* 51, 194-202.

KARNIYCHUK, U., NAUWYNCK, H. (2009): Quantitative changes of sialoadhesin and CD163 positive macrophages in the implantation sites and organs of porcine embryos/fetuses during gestation. *Placenta* 30, 497-500.

KASEMPIMOLPORN, S., SAENGSEESOM, W., LUMLERTDACHA, B., SITPRIJA, V. (2000): Detection of rabies virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3098-3099.

KAUFMAN, E., LAMSTER, I.B. (2002): The diagnostic applications of saliva - a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 13, 197-212.

KITTAWORNAT, A., ZIMMERMAN, J.J. (2011): Toward a better understanding of pig behavior and pig welfare. *Animal Health Research Reviews* 12, 25-32.

KITTAWORNAT, A., ENGLE, M., PANYASING, Y., OLSEN, C., SCHWARTZ, K., RICE, A., LIZANO, S., WANG, C., ZIMMERMAN, J. (2013): Kinetics of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) humoral immune response in swine serum and oral fluids collected from individual boars. *BMC Veterinary Research* 9, doi:10.1186/1746-6148-9-61.

KITTAWORNAT, A., PRICKETT, J., WANG, C., OLSEN, C., IRWIN, C., PANYASING, Y., BALLAGI, A., RICE, A., MAIN, R., JOHNSON, J., RADEMACHER, C., HOOGLAND, M., ROWLAND, R., ZIMMERMAN, J. (2012): Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 262-269.

9. Literaturverzeichnis

KLINGE, K.L., VAUGHN, E.M., ROOF, M.B., BAUTISTA, E.M., MURTAUGH, M.P. (2009): Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virology Journal* 6, 177.

KOENIG, H.E., SÓTONYI, P., LIEBICH, H.G. (2012): Verdauungsapparat (Apparatus digestorius). In: Koenig H.E. und Liebich H.G.: *Anatomie der Haussäugetiere*. 5. Aufl., Schattauer GmbH, Stuttgart, S. 301-367.

KOINIG, H. (2010): Experimentelle Infektion von Endmastschweinen mit PRRSV. Diplomarbeit, Vet. Med. Univ. Wien, pp. 40.

KRASSNIG, G., KRASSNIG, R., GRAMMER, H., SCHWEIGHARDT, H. (1994): Auftreten des "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome" (PRRS) in Österreich - Fallbericht. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 81, 285-289

LANGENHORST, R.J., LAWSON, S., KITTAWORNAT, A., ZIMMERMAN, J.J., SUN, Z., LI, Y., CHRISTOPHER-HENNINGS, J., NELSON, E.A., FANG, Y. (2012): Development of a fluorescent microsphere immunoassay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using oral fluid samples as an alternative to serum-based assays. *Clinical and Vaccine Immunology* 19, 180-189.

LAROCHELLE, R., MARDASSI, H., DEA, S., MAGAR, R. (1996): Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 8, 3-10.

LINDHAUS, W., LINDHAUS, B. (1991): Rätselhafte Schweinekrankheit. *Praktischer Tierarzt* 5, 423-425.

LINHARES, D.C., CANO, J.P., WETZELL, T., NEREM, J., TORREMORELL, M., DEE, S.A. (2012): Effect of modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) vaccine on the shedding of wild-type virus from an infected population of growing pigs. *Vaccine* 30, 407-413.

9. Literaturverzeichnis

LUNNEY, J.K., CHEN, H. (2010): Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Virus Research* 154, 161-169.

MAGAR, R., LAROCHELLE, R., ROBINSON, Y., DUBUC, C. (1993): Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. *Canadian Journal of Veterinary Research* 57, 300-304.

MATEU, E., TELLO, M., COLL, A., CASAL, J., MARTIN, M. (2006): Comparison of three ELISAs for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary Record* 159, 717-718.

MORIOKA, K., FUKAI, K., YOSHIDA, K., YAMAZOE, R., ONOZATO, H., OHASHI, S., TSUDA, T., SAKAMOTO, K. (2009): Foot-and-mouth disease virus antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay using multiserotype-reactive monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 3663-3668.

MUR, L., GALLARDO, C., SOLER, A., ZIMMERMAN, J., PELAYO, V., NIETO, R., SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M., ARIAS, M. (2013): Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever. *Veterinary Microbiology* 165, 135-139.

MURTAUGH, M.P., STADEJEK, T., ABRAHANTE, J.E., LAM, T.T., LEUNG, F.C. (2010): The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research* 154, 18-30.

NATHUES, H., MEEMKEN, D., HARDER, T.C., DOHERR, M.G., GROTHA, I., GREISER-WILKE, I. (2009): Frequency of PRRS live vaccine virus (European and North American genotype) in vaccinated and non-vaccinated pigs submitted for respiratory tract diagnostics in North-Western Germany. *Preventive Veterinary Medicine* 92, 31-37.

NATHUES, H., TEGELER, R., GRUMMER, B., GROSSE BEILAGE, E. (2011a): Erregernachweis bei Reproduktionsstörungen in Schweinebeständen - Retrospektive Auswertung labordiagnostischer Untersuchungen. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Großtiere - Nutztiere* 39, 155-161.

9. Literaturverzeichnis

NATHUES, H., NIENHOFF, H., GROSSE BEILAGE, E., BLAHA, T., RITZMANN, M., REINER, G., LAHRMANN, K.H., KAUFFHOLD, J., WABERSKI, D., HENNIG-PAUKA, I., WENDT, M., WALDMANN, K.H. (2011b): Monitoring-Systeme in Zuchtschweinebeständen aus Sicht der Wissenschaft. Deutsches Tierärzteblatt, 10, 1324-1334

NEUMANN, E.J., KLIEBENSTEIN, J.B., JOHNSON, C.D., MABRY, J.W., BUSH, E.J., SEITZINGER, A.H., GREEN, A.L., ZIMMERMAN, J.J. (2005): Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. Journal of the American Veterinary Medical Association 227, 385-392.

NIEUWENHUIS, N., DUINHOF, T.F., VAN NES, A. (2012): Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. Veterinary Record 170, 225.

OKUDA, Y., KURODA, M., ONO, M., CHIKATA, S., SHIBATA, I. (2008): Efficacy of vaccination with porcine reproductive and respiratory syndrome virus following challenges with field isolates in Japan. The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science 70, 1017-1025.

OLEKSIEWICZ, M., BØTNER, A., MADSEN, K.G., STORGAARD, T. (1998): Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. Veterinary Microbiology 64, 7-22.

OLSEN, C., COETZEE, J., KARRIKER, L., KITTAWORNAT, A., LIZANO, S., MAIN, R., MEISZBERG, A., PANYASING, Y., WANG, C., ZIMMERMAN, J. (2012): Effect of sample collection material on detection of PRRSV antibody in oral fluid. Proceedings 22nd International Pig Veterinary Society Congress, Jeju, Südkorea, 986.

OLSEN, C., WANG, C., CHRISTOPHER-HENNINGS, J., DOOLITTLE, K., HARMON, K.M., ABATE, S., KITTAWORNAT, A., LIZANO, S., MAIN, R., NELSON, E.A., OTTERSON, T., PANYASING, Y., RADEMACHER, C., RAUH, R., SHAH, R., ZIMMERMAN, J. (2013): Probability of detecting Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection using pen-based swine oral fluid specimens as a function of within-pen prevalence. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 25, 328-335.

9. Literaturverzeichnis

OPRIESSNIG, T., MADSON, D., PRICKETT, J., KUHAR, D., LUNNEY, J., ELSENER, J., HALBUR, P. (2008): Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. *Veterinary Microbiology* 131, 103-114.

OTAKE, S., DEE, S., CORZO, C., OLIVEIRA, S., DEEN, J. (2010): Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Veterinary Microbiology* 145, 198-208.

PALZER, A., RITZMANN, M., WOLF, G., HEINRITZI, K. (2008): Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Veterinary Record* 162, 267-271.

PANYASING, Y., GOODELL, C., WANG, C., KITTAWORNAT, A., PRICKETT, J., SCHWARTZ, K., BALLAGI, A., LIZANO, S., ZIMMERMAN, J. (2012): Detection of Influenza A Virus Nucleoprotein Antibodies in Oral Fluid Specimens From Pigs Infected Under Experimental Conditions Using a Blocking ELISA. *Transboundary and Emerging Diseases*, doi: 10.1111/tbed.12019.

PITKIN, A., DEEN, J., DEE, S. (2009a): Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Canadian Journal of Veterinary Research* 73, 298-302.

PITKIN, A., DEEN, J., OTAKE, S., MOON, R., DEE, S. (2009b): Further assessment of houseflies (*Musca domestica*) as vectors for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under field conditions. *Canadian Journal of Veterinary Research* 73, 91-96.

POLI, A., GIANNELLI, C., PISTELLO, M., ZACCARO, L., PIERACCI, D., BENDINELLI, M., MALVALDI, G. (1992): Detection of salivary antibodies in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 2038-2041.

9. Literaturverzeichnis

POLLACI, G., CERAULO, S. (1909): Das agglutinationsvermögen einiger Körperflüssigkeiten beim Mediterranfieber. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten (I) 52, 268-275.

POLSEN, D. (2012): Scaling and sustnading effect large-scale PRRS control - it takes a committed village, and a (full) toolbox. Proceedings international PRRS symposium, Kansas City, USA, 30.

PRICKETT, J.R., ZIMMERMAN, J.J. (2010): The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. Animal Health Research Reviews 11, 207-216.

PRICKETT, J., JOHNSON, J., MURTAUGH, M., PUVANENDIRAN, S., WANG, C., ZIMMERMAN, J., OPRIESSNIG, T. (2011): Prolonged Detection of PCV2 and Anti-PCV2 Antibody in Oral Fluids Following Experimental Inoculation. Transboundary and Emerging Diseases 58, 121-127.

PRICKETT, J., SIMER, R., CHRISTOPHER-HENNINGS, J., YOON, K.-., EVANS, R.B., ZIMMERMAN, J.J. (2008a): Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: A longitudinal study under experimental conditions. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 20, 156-163.

PRICKETT, J.R., KIM, W., SIMER, R., YOON, K., ZIMMERMAN, J. (2008b): Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. Journal of Swine Health and Production 16, 86-91.

PRICKETT, J.R., CUTLER, S., KINYON, J.M., NADINE NABERHAUS, M.S., STENSLAND, W.R., YOON, K., ZIMMERMAN, J.J. (2010): Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and antibody in swine oral fluid. Journal of Swine Health and Production 18, 187-195.

PRIETO, C., CASTRO, J. (2000): Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in gestating sows. Veterinary Research 31, 56-57.

9. Literaturverzeichnis

PUY, C.L. (2006): The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal* 11, E449-55.

RAMIREZ, A., WANG, C., PRICKETT, J.R., POGRANICHNIY, R., YOON, K., MAIN, R., JOHNSON, J.K., RADEMACHER, C., HOOGLAND, M., HOFFMANN, P., KURTZ, A., KURTZ, E., ZIMMERMAN, J. (2012): Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Preventive Veterinary Medicine* 104, 292-300.

REVILLA-FERNÁNDEZ, S., WALLNER, B., TRUSCHNER, K., BENCZAK, A., BREM, G., SCHMOLL, F., MUELLER, M., STEINBORN, R. (2005): The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen. *Journal of Virological Methods* 126, 21-30.

ROBERTS, N.E., ALMOND, G.W. (2003): Infection of growing swine with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae* - Effects on growth, serum metabolites, and insulin-like growth factor-I. *The Canadian Veterinary Journal* 44, 31.

ROBERTS, J. (2003): Serological monitoring in infected sow herds. In J. ZIMMERMAN und K.-J. YOON: *PRRS Compendium*. 2nd Edition., National Pork Board, Des Moines, Iowa, S. 75-86.

ROMAGOSA, A., GRAMER, M., JOO, H.S., TORREMORELL, M. (2012): Sensitivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. *Influenza and other Respiratory Viruses* 6, 110-118.

ROVIRA, A., REICKS, D., MUNOZ-ZANZI, C. (2007): Evaluation of surveillance protocols for detecting porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boar studs by simulation modeling. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 492-501.

ROWLAND, R.R. (2010): The interaction between PRRSV and the late gestation pig fetus. *Virus Research* 154, 114-122.

ROWLAND, R., MORRISON, R. (2012): Challenges and Opportunities for the Control and Elimination of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Transboundary and Emerging Diseases* 59, 55-59.

9. Literaturverzeichnis

SAMYN, N., DE BOECK, G., VERSTRAETE, A.G. (2002): The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers. *Journal of Forensic Sciences* 47, 1380-1387.

SATTLER, T., STEINRIGL, S., REVILLA-FERNÁNDEZ, S., SCHMOLL, F. (2013): Nachweis von PRRSV und Antikörpern in Speichelproben. *Proceedings Vierte Frühjahrstagung der österreichischen Schweinepraktiker - Von Praktikern für Praktiker*, Semmering, Österreich, 40-47.

SCHMOLL, F., STEINRIGL, A., REVILLA-FERNÁNDEZ, S., SATTLER, T. (2012): PRRS: Diagnostik – Interpretation – Strategien. *Proceedings 6. Leipziger Tierärztekongress Band 3*, Leipzig, Deutschland, 210-212.

SCOTT, K., TAYLOR, L., GILL, B.P., EDWARDS, S.A. (2007): Influence of different types of environmental enrichment on the behaviour of finishing pigs in two different housing systems: 2. Ratio of pigs to enrichment. *Applied Animal Behaviour Science* 105, 51-58.

SEDDON, Y., GUY, J., EDWARDS, S. (2012): Optimising oral fluid collection from groups of pigs: Effect of housing system and provision of ropes. *The Veterinary Journal* 193, 180-184.

SISSON, S (1975): Sisson and Grossman's The anatomy of the domestic animals. Volumes 1. In: Getty R., Rosenbaum C.E., Ghoshal G. and Hillman D.: The anatomy of the domestic animals. Volumes 1. 5th edn. Aufl., WB Saunders Company., S. 1269-1282.

SMITH, D.R., GRAY, J., MOXLEY, R.A., YOUNTS-DAHL, S., BLACKFORD, M., HINKLEY, S., HUNGERFORD, L., MILTON, C., KLOPFENSTEIN, T.J. (2004): A diagnostic strategy to determine the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O 157 status of pens of feedlot cattle. *Epidemiology and Infection* 132, 297-302.

SMITH, D., MOXLEY, R., CLOUSER, S., FOLMER, J., HINKLEY, S., ERICKSON, G., KLOPFENSTEIN, T. (2005): Use of rope devices to describe and explain the feedlot ecology of *Salmonella* by time and place. *Foodborne Pathogens & Disease* 2, 61-69.

9. Literaturverzeichnis

STADEJEK, T., OLEKSIEWICZ, M., POTAPCHUK, D., PODGORSKA, K. (2006): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *Journal of General Virology* 87, 1835-1841.

STADEJEK, T., STANKEVICIUS, A., STORGAARD, T., OLEKSIEWICZ, M.B., BELAK, S., DREW, T., PEJSK, Z. (2002): Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *Journal of General Virology* 83, 1861-1873.

STRECKFUS, C., BIGLER, L. (2002): Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Diseases* 8, 69-76.

THOMPSON, M., SCHULZ-DALQUIST, L., CANO, J.P. (2012): Indirect transmission of PRRS virus in the farrowing rooms of a 6000-sow herd. *Proceedings AASV Annual meeting: Integration science, welfare, an economics in practice, Denver, USA*, 81-82.

TOPLAK, I., STUKELJ, M., GRACIEUX, P., BALK, G., LARSEN, L., RAUH, R. (2012): Detection of PRRSV in 218 field samples using six molecular methods: what we are looking for? *Proceedings EuroPRRS - Understanding and combating PRRS in Europe, Budapest, Ungarn*, 38-40.

TURNER, S., ALLCROFT, D., EDWARDS, S. (2003): Housing pigs in large social groups: a review of implications for performance and other economic traits. *Livestock Production Science* 82, 39-51.

TURNER, S., SINCLAIR, A., EDWARDS, S. (2000): The interaction of liveweight and the degree of competition on drinking behaviour in growing pigs at different group sizes. *Applied Animal Behaviour Science* 67, 321-334.

VIERA, A.J., GARRETT, J.M. (2005): Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Family Medicine* 37, 360-363.

WEERD, H.A., DOCKING, C.M., DAY, J.E., BREUER, K., EDWARDS, S.A. (2006): Effects of species-relevant environmental enrichment on the behaviour and productivity of finishing pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 99, 230-247.

9. Literaturverzeichnis

WENSVOORT, G., TERPSTRA, C., POL, J., TER LAAK, E., BLOEMRAAD, M., DE KLUYVER, E., KRAGTEN, C., VAN BUITEN, L.D., DEN BESTEN, A., WAGENAAR, F. (1991): Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly* 13, 121-130.

WILLS, R.W., ZIMMERMAN, J.J., YOON, K., SWENSON, S.L., HOFFMAN, L.J., MCGINLEY, M.J., HILL, H.T., PLATT, K.B. (1997): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Veterinary Microbiology* 57, 69-81.

YAEGER, M.J. (2002): The diagnostic sensitivity of immunohistochemistry for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lung of vaccinated and unvaccinated swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 15-19.

YAMAMOTO, J.K., SPARGER, E., HO, E., ANDERSEN, P.R., O'CONNOR, T., MANDELL, C., LOWENSTINE, L., MUNN, R., PEDERSEN, N. (1988): Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *American Journal of Veterinary Research* 49, 1246-1258.

YOO, D., HAN, M., KIM, C.Y., SUN, Y. (2012): Ten years of research in structural function of PRRSV proteins. *Proceedings international PRRS symposium, Kansas City, USA*, 33-33.

YOON, I.J., JOO, H.S., CHRISTIANSON, W.T., KIM, H.S., COLLINS, J.E., MORRISON, R.B., DIAL, G.D. (1992): An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4, 144-147.

YOON, I.J., JOO, H.S., GOYAL, S.M., MOLITOR, T.W. (1994): A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *Journal of veterinary diagnostic investigation : American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 6, 289-292.

ZHOU, L., H.YANG (2010): Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Research* 154, 31-37.

9. Literaturverzeichnis

ZIEBUHR, J., SNIJDER, E.J., GORBALENYA, A.E. (2000): Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *Journal of General Virology* 81, 853-879.

ZIMMERMAN, J., BENFIELD, D.A., DEE, S., MURTAUGH, M.P., STADEJEK, T., STEVENSON, G.W., TORREMORELL, M. (2012): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arterivirus). In: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J. and Stevenson G.W.: *Diseases of Swine*. 10. Aufl., Blackwell Publishing, Ames, S. 461-486.

ZONDERLAND, J., VERMEER, H., VEREIJKEN, P., SPOOLDER, H. (2003): Measuring a pig's preference for suspended toys by using an automated recording technique. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal of Scientific Research and Development*, 5, 1-11.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: (a) Subtypen des EU-Genotyps; (b) PRRSV EU- und US-Genotypen; Einteilung anhand der Differenzierung des ORF (open reading frame) 5. Nach STADEJEK et al. (2006)	4
Abbildung 2: Interaktion zwischen PRRSV und Makrophagen; beteiligte Strukturproteine des PRRSV und Makrophagen assoziierte Rezeptoren die für die Virus-Zellen-Interaktion benötigt werden; Sn: Sialoadhesin-Rezeptor; HepS: Heparansulfat	5
Abbildung 3: Ohrspeicheldrüsen beim Schwein: 1: Glandula (Gl.) parotis; 2: Glandulae (Gll.) buccales dorsales u. ventrales; 3: Gll. sublingualis monostomatica u. polystomatica; 4: Gl. mandibularis. Nach KÖNIG et al. (2012).	12
Abbildung 4: Zusammensetzung des Speichels. Nach KAUFMAN und LAMBSTER (2002)	13
Abbildung 5: Studienaufbau: Effekt der Lagerungszeit und -temperatur auf den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente. BB: Baumwollstrick (Sankt Josef Werkstatt); CP: Cool Pack; RT: Raumtemperatur; neg: negativer Speichel; Chlor: Chohexidine; ProtK: Proteinase K; > Zentri: höhere Zentrifugation (20.000 × g für 10 Minuten).....	21
Abbildung 6: Baumwollseil zur Gewinnung der Speichelproben beim Schwein (Sankt Josef Werkstatt, Dorfen, Deutschland).....	24
Abbildung 7: Gebrauchsanweisung zur Gewinnung der Speichelproben beim Schwein (TEGO, ILT Animal Healthcare, Melbourne, Australien)	25
Abbildung 8: 30-minütige Kaustrickpräsentation zur Gewinnung der Speichelproben; Schweine kauen am Baumwollseil	27

10. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 9:** Pipettierschema für die Gelelektrophorese. + Exko: positive Extraktionskontrolle; Ø MM: negative Mastermixkontrolle; + PCR: positive PCR-Kontrolle 37
- Abbildung 10:** Gelelektrophorese-Protokoll, zur Identifikation der auftragenden Proben, bp: Basenpaare; Min: Minute; V: Volt; Stdd: Standard 39
- Abbildung 11:** 7. Lebenswoche. Prozentueller Anteil der Schweine am Kastrick innerhalb von 30 Minuten. *signifikanter Anstieg des Anteil der Schweine bis Minute 20 42
- Abbildung 12:** 12. Lebenswoche; prozentueller Anteil der Schweine am Kastrick innerhalb von 30 Minuten. * signifikanter Anstieg des Anteil der Schweine bis Minute 10 42
- Abbildung 13:** Einfluss der Lagerungszeit und -temperatur auf den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente in einem Zeitintervall von 72 Stunden (h). BB: Baumwollstricke St. Josef Werkstatt; TEGO: TEGO oral fluid Kit. 44
- Abbildung 14:** Darstellung RT-PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese. Nachgewiesen wurden RT-PCR-Produkte des ORF (open reading frame) 7. Positive PCR-Produkte hatten eine Größe von 385 bp (Basenpaare) Typ 1 und 410 bp Typ 2. Stdd: Standard; Ø MM: negative PCR-Kontrolle; + EU PCR: positive PCR Kontrolle EU-Typ; + US PCR: positive PCR Kontrolle US-Typ 46
- Abbildung 15:** Spannweite ELISA P/PK-Verhältnis Ergebnisse der Betriebe 1 und 4. Die ELISA Ergebnisse wurden anhand der Altersklassen aufgelistet. Proben mit einem P/PK-Verhältnis von $\geq 0,40$ sind als positiv zu Werten. Signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen (a/b p = 0,016). AF: Aufzucht- und Zuchtferkel 47
- Abbildung 16:** Anzahl der positiven Buchten; es wurden Speichel- und Serumproben verglichen; eine signifikante hervorragende Übereinstimmung im Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper (ELISA; $\kappa = 0,829$; p < 0,001), keine Übereinstimmung im Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente (PCR; $\kappa = 0,347$; p = 0,75) 50

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übertragung des PRRSV und Dauer der Ausscheidung	6
Tabelle 2: Übersicht humaner Krankheitserreger, die im Speichel indirekt oder direkt nachgewiesen werden können. Nach PRICKETT und ZIMMERMAN (2011).	15
Tabelle 3: Berechnung der Stichprobengröße um ein oder mehr positive Proben in einer infizierten Population zu detektieren; Irrtumswahrscheinlichkeit von 95 % Wahrscheinlichkeit (Canon u. Roe, 1982).	19
Tabelle 4: Übersicht über die Studienbetriebe 1-4 und die Anzahl der am Betrieb gehaltenen Zuchtsauen. Auswahlkriterien waren die Betriebsgröße und der PRRSV-Status der Betriebe.	23
Tabelle 5: Anzahl der Blut- und Speichelproben, betriebsweise dargestellt.....	23
Tabelle 6: Aufteilung der Schweine pro Bucht und Alter	26
Tabelle 7: Mastermixzusammensetzung der quantitativen reverse transcriptase (qRT)-PCR.....	33
Tabelle 8: Verwendetes Thermalprofil	34
Tabelle 9: Mastermixzusammensetzung der konventionellen RT-PCR	35
Tabelle 10: Thermalprofil für Thermocycler	36
Tabelle 11: Mittelwerte der gewonnenen ml nach einer Strickexposition von 30 Minuten.....	43
Tabelle 12: Reduktionsfaktor der Anzahl an genomischen Kopien / ml im zeitlichen Verlauf von 92 Stunden. vs: versus; BB: Baumwollstricke St. Josef Werkstatt; TEGO: TEGO oral fluid Kit.....	45

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 13: Einfluss der Behandlung des Speichels auf den Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente. BB = Baumwollstricke St. Josef Werkstatt; TEGO = TEGO oral fluid Kit.....	45
Tabelle 14: Anzahl positiver und negativer PCR und ELISA Ergebnisse; a: Ergebnisse Zuchtsauen ($\kappa = 0,018$; $p = 0,537$); b: Ergebnisse Aufzucht- und Zuchtferkel ($\kappa = 0,191$; $p = 0,229$).....	48
Tabelle 15: Aufzucht- und Zuchtferkel. PCR und ELISA Ergebnisse der Speichel- und Serumproben im Vergleich. pos: positive Ergebnisse	49
Tabelle 16: Übersicht der durchschnittlichen Herdengröße, Sero- und Virusprävalenz, sowie benötigte minimale Stichprobengröße. AF: Aufzucht- und Zuchtferkel; ZS: Zuchtsau; OF: Speichelprobe.....	49
Tabelle 17: Darstellung der qRT-PCR Ergebnisse der positiv getesteten Speichelproben aus den Betrieben 1 und 4.....	50
Tabelle 18: Kreuztabelle für den Vergleich des Antikörpernachweises in Serum- und Speichelproben.....	50
Tabelle 19: Kreuztabellen für den Vergleich des Virusnachweises in Serum- und Speichelproben.....	51
Tabelle 20: Übersicht untersuchter Proben. PCR und ELISA positive Ergebnisse und die errechnete Virus- und Seroprävalenz betriebsweise aufgelistet	52

12. Danksagung

Bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit haben mich viele Personen unterstützt, denen ich an dieser Stelle danken möchte. Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ. Prof. Dr. med. vet. M. Ritzmann für die Auswahl des aktuellen und interessanten Themas, sowie der stetigen Unterstützung während der letzten zwei Jahre. Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Schweine, Wien, für die unbezahlbare Hilfe während der Betriebsbesuche und der Probenentnahme bedanken. Ich möchte mich auch herzlichst bei Frau Dr. B. Fasching und Dr. U. Friedmann für Ihre Unterstützung bedanken. Außerdem möchte ich mich bei den Landwirten der vier Betriebe bedanken, die unseren „überfallartigen Besuch“ toleriert haben. Ein ganz besonderer Dank gilt Frau H. Söllner, B.Sc. die mir durch ihre Expertise bei der Durchführung und Auswertung der Labormethoden geholfen hat und mir in der ein oder anderen verzweifelten Minute beigestanden ist. Ich möchte mich auch beim Verein der Freunde und Förderern der Schweinemedizin und dem Verein steirischer Tiergesundheitsdienst für die finanzielle Unterstützung bedanken.

Zuletzt möchte ich meinen Freunden und vor allem meinen Eltern, Harald und Martina Lütke, die moralische Unterstützung während meiner Doktorarbeit danken.

13. Anhang

- Verwendetes Material und Reagenzien
- Geräte
- Verwendete Protokolle
- Ergebnisse der Laboruntersuchungen, betriebsweise aufgelistet

13. Anhang

Nachweis PRRSV-spezifischer Antikörper im Serum und Speichel

Aqua destilata

HerdChek® PRRS X3 (IDEXX Laboratories GmbH, Ludwigsburg, Deutschland): Mikrotiterplatten, 96-wells, mit rekombinantem PRRS-Virusantigen (inaktiviert) beschichtet, PRRSV-positive Kontrolle, PRRSV-negative Kontrolle, Anti-Schwein-IgG, Meerrettichperoxidase (=HRPO)-Konjugat, Probenverdünner, Waschkonzentrat (x10), TMB-Substrat, (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), Stopplösung (SDS; Sodiumdodecylsulfat)

Kolbenhubpipetten für 10 µl – 5 ml (Satorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland)

Pipettenspitzen für 10 µl – 5 ml (Satorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland)

Glasröhrchen DURAN 12 x 75 mm (VWR, Wien, Österreich)

Minizentrifuge (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Vortexer: Vortex Genie 2 (VWR, Wien, Österreich)

DYNEX DS2 automated ELISA System (Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland)

15 ml Reagent Tubes (Biomedica, Wien, Österreich)

20 ml Reagent Tubes (Biomedica, Wien, Österreich)

2 ml Standard Reagent Tubes (Biomedica, Wien, Österreich)

Dilution Stripes (Biomedica, Wien, Österreich)

Messzylinder: 1000 ml für die Waschlösung

Microplate Reader Model 680 (Bio-Rad Laboratories GesmbH., Wien, Österreich)

13. Anhang

Extraktion viraler RNA

QIAamp® Viral RNA Mini Kit, (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)

RNase-Free DNase Set (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)

Zentrifuge: Mikro 220 R (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland)

Kolbenhubpipetten (Satorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland)

Vortexer: Vortex Genie 2 (VWR, Wien, Österreich)

DEPC-Wasser, PCR-grade (Invitrogen, Lofer, Österreich)

Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente mittels konventioneller RT-PCR

Sterilbänke mit UV-Einrichtung (Lamin Air, Burgdorf, Schweiz)

Biometra T300 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland)

Kolbenhubpipette (Satorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland)

Handzentrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Vortexer (VWR, Wien, Österreich)

Minzentrifuge Unifuge (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Sterile 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (Biozym, Kundl, Österreich)

Sterile 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Diethylpyrocarbonate (DEPC), PCR-grade (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Qiagen One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Ribolock RNase Inhibitor (Fisher Scientific - Austria GmbH, Wien, Österreich)

13. Anhang

Gelelektrophorese

Electrophorese Power supply Model 250 EX (Life Technologies, Carlsbad, USA)

Kolbenhubpipette (Satorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland)

INTAS Gel imager (Biometra, Wien, Österreich)

Magnetrührer MR 3002 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)

Analysenwaage SP051 (SCALTEC Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland)

Minizentrifuge Unifuge (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Mikrowelle Severin 700 (Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland)

3.8.2. Verwendetes Material

Gelkammer (Bio-Rad Laboratories GesmbH., Wien, Österreich)

Gelkämme (Bio-Rad Laboratories GesmbH., Wien, Österreich)

Geltablett (Bio-Rad Laboratories GesmbH., Wien, Österreich)

Gelgießstand (Bio-Rad Laboratories GesmbH., Wien, Österreich)

Elektrophorese-Kam (Bio-Rad Laboratories GesmbH., Wien, Österreich)

Glaskolben (VWR, Wien, Österreich)

peqGold Universal Agarose (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Pollin, Österreich)

10x TAE-Pufferkonzentrat, pH 8,3 (Merck GesmbH, Wien, Österreich)

DNA-Längenstandard, 100 bp DNA Marker (Life Technologies, Carlsbad, USA)

Bromphenolblau (Merck GesmbH, Wien, Österreich)

Sucrose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Xylen-Cyanol (Life Technologies, Carlsbad, USA)

TE-Puffer (Life Technologies, Carlsbad, USA)

13. Anhang

Aqua bidest. Aus Filteranlage (Milipore, Wien, Österreich)

Midori Green DNA-und RNA Farbstoff (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)

3.8.3. Herstellung Reagenzlösungen

1 x TAE Gebrauchs-Pufferlösung: 50 ml 10x TAE Puffer.
+ 450 ml Aqua destillata (A.d.)
entspricht einer 1:10 Verdünnung

Ladepuffer: 25 ml Aqua dest.
25 ml Glycerin
50 mg Bromphenolblau

DNA-Marker-Gebrauchslösung: 10 µl DNA Längenstandard, 100 bp
90 µl Ladepuffer

1 x TAE-Laufpuffer mit Midori Green 540 ml Aqua bidest.
60 ml 10 x TAE-Puffer
24 µl Midori Green
In dunkler Glasflasche lagern (5-8 °C)

Herstellung Agarosegel: 2 %iges Gel: 2 g Agarose
100 ml 1x TAE-Puffer

13. Anhang

Nachweis PRRSV-spezifischer Genomfragmente mittels qRT-PCR

Sterilbänke mit UV-Einrichtung (Lamin Air, Burgdorf, Schweiz)

Stratagene MX 3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Kolbenhubpipetten (Satorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland)

Handzentrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Vortexer (VWR, Wien, Österreich)

Sterile 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (Biozym, Kundl, Österreich)

Sterile 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

DEPC-Wasser, PCR-grade (Applied Biosystems, Foster City, USA)

TaqMan[®] NA and EU PRRSV and Xeno[™] RNA Controls (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Taqman NA und EU PRRSV Reagents (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Auswertungsbogen für die Tier-Strick-Interaktion. Für jede Minute wurde notiert, wie viele und welche Tiere pro Bucht am Kaustrick gekaut haben.

Datum:	ml gesamt:	Zeit gesamt:
Uhrzeit:	Betrieb:	
Anzahl der Kaustricke:		
Anzahl der Tiere:	Buchtennummer:	
Minute	Ferkelnummer	Anzahl
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		

Besonderheiten, was ist aufgefallen:

Laboreergebnisse Betrieb 1, 0 = negativ; 1 = positiv

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1201001	0,004	0	1	1201026	0,37	0	0	1201051	1,491	1	0	1201076	2,062	1	0
1201002	-0,005	0	0	1201027	0,47	1	0	1201052	0,154	0	0	1201077	2,165	1	0
1201003	2,504	1	0	1201028	1,337	1	0	1201053	0,359	0	0	1201078	0,388	0	0
1201004	0,033	0	0	1201029	1,29	1	1	1201054	-0,029	0	0	1201079	0,596	1	0
1201005	1,511	1	1	1201030	0,09	0	0	1201055	0,473	1	0	1201080	1,736	1	0
1201006	1,633	1	0	1201031	1,33	1	0	1201056	0,455	1	0	1201081	0,006	0	0
1201007	2,715	1	0	1201032	1,537	1	0	1201057	0,598	1	0	1201082	0,675	1	0
1201008	0,645	1	0	1201033	-0,003	0	0	1201058	0,006	0	0	1201083	1,653	1	0
1201009	0,209	0	1	1201034	0,212	0	0	1201059	0,684	1	0	1201084	0,854	1	0
1201010	0,002	0	0	1201035	-0,001	0	0	1201060	0,129	0	0	1201085	-0,033	0	0
1201011	-0,012	0	0	1201036	0,358	0	0	1201061	0,173	0	0	1201086	0,239	0	0
1201012	0,054	0	0	1201037	0,688	1	0	1201062	0,542	1	0	1201087	-0,031	0	0
1201013	2,085	1	1	1201038	0,352	0	0	1201063	0,528	1	0	1201088	0,085	0	0
1201014	1,179	1	0	1201039	1,719	1	1	1201064	-0,007	0	0	1201089	-0,013	0	0
1201015	1,015	1	0	1201040	0	0	0	1201065	-0,012	0	0	1201090	-0,012	0	0
1201016	0,867	1	1	1201041	0,034	0	1	1201066	0,097	0	0	1201091	0,186	0	0
1201017	0,328	0	0	1201042	-0,031	0	1	1201067	0,166	0	0	1201092	0,041	0	0
1201018	1,99	1	1	1201043	0,086	0	0	1201068	0,206	0	0				
1201019	0,009	0	0	1201044	0,004	0	1	1201069	0,218	0	0				
1201020	2,323	1	0	1201045	0,382	0	0	1201070	1,557	1	0				
1201021	0,217	0	0	1201046	1,209	1	1	1201071	0,363	0	0				
1201022	2,383	1	1	1201047	-0,031	0	0	1201072	0,225	0	0				
1201023	2,643	1	0	1201048	0,051	0	0	1201073	-0,018	0	0				
1201024	1,037	1	1	1201049	-0,014	0	0	1201074	0,237	0	0				
1201025	6,863	1	0	1201050	0,63	1	0	1201075	-0,008	0	0				

Laboreergebnisse Betrieb 2, 0 = negativ; 1 = positiv

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1202001	0,01	0	0	1202036	0,004	0	0	1202061	0,003	0	0	1202086	-0,02	0	0
1202002	0,019	0	0	1202037	0,008	0	0	1202062	0,009	0	0	1202087	0,002	0	0
1202003	0,002	0	0	1202038	0,027	0	0	1202063	-0,005	0	0	1202088	-0,011	0	0
1202004	0,022	0	0	1202039	0,001	0	0	1202064	-0,001	0	0	1202089	-0,013	0	0
1202005	-0,007	0	0	1202040	0	0	0	1202065	0,012	0	0	1202090	-0,013	0	0
1202006	0,012	0	0	1202041	-0,001	0	0	1202066	0,008	0	0	1202091	-0,003	0	0
1202007	-0,002	0	0	1202042	-0,006	0	0	1202067	-0,004	0	0	1202092	0,015	0	0
1202008	0,026	0	0	1202043	0,005	0	0	1202068	-0,017	0	0	1202093	-0,016	0	0
1202009	0,01	0	0	1202044	0,008	0	0	1202069	-0,011	0	0	1202094	-0,021	0	0
1202020	0,01	0	0	1202045	0,037	0	0	1202070	-0,015	0	0	1202095	-0,018	0	0
1202021	0,013	0	0	1202046	0,007	0	0	1202071	-0,002	0	0	1202096	-0,017	0	0
1202022	0,003	0	0	1202047	0,035	0	0	1202072	-0,011	0	0	1202097	-0,029	0	0
1202023	-0,006	0	0	1202048	0,038	0	0	1202073	0,005	0	0	1202098	-0,011	0	0
1202024	0	0	0	1202049	-0,002	0	0	1202074	0,002	0	0	1202099	-0,022	0	0
1202025	0,09	0	0	1202050	0,03	0	0	1202075	0,006	0	0	1202100	-0,017	0	0
1202026	0	0	0	1202051	-0,002	0	0	1202076	-0,001	0	0	1202101	-0,016	0	0
1202027	-0,006	0	0	1202052	0,022	0	0	1202077	-0,007	0	0	1202102	-0,023	0	0
1202028	0,009	0	0	1202053	0,001	0	0	1202078	0,005	0	0	1202103	-0,008	0	0
1202029	0,002	0	0	1202054	0,027	0	0	1202079	-0,007	0	0	1202104	-0,001	0	0
1202030	0,01	0	0	1202055	0,011	0	0	1202080	0,061	0	0	1202105	-0,007	0	0
1202031	0,016	0	0	1202056	-0,005	0	0	1202081	-0,01	0	0	1202106	-0,011	0	0
1202032	0	0	0	1202057	0,007	0	0	1202082	0,046	0	0	1202107	-0,012	0	0
1202033	0,017	0	0	1202058	0,037	0	0	1202083	-0,009	0	0	1202108	-0,001	0	0
1202034	0,005	0	0	1202059	0	0	0	1202084	-0,015	0	0	1202109	0,001	0	0
1202035	0,023	0	0	1202060	0,001	0	0	1202085	-0,009	0	0	1202110	-0,002	0	0

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1202111	0	0	0	1202137	-0,013	0	0	1202162	-0,008	0	0	1202203	-0,002	0	0
1202112	0,007	0	0	1202138	-0,006	0	0	1202163	0,077	0	0	1202204	-0,013	0	0
1202113	-0,005	0	0	1202139	-0,009	0	0	1202164	0	0	0	1202205	-0,019	0	0
1202114	-0,001	0	0	1202140	-0,003	0	0	1202165	-0,004	0	0	1202206	-0,006	0	0
1202115	0,003	0	0	1202141	0,002	0	0	1202168	-0,023	0	0	1202207	-0,016	0	0
1202116	0,005	0	0	1202142	-0,002	0	0	1202169	-0,021	0	0	1202208	-0,045	0	0
1202117	0,002	0	0	1202143	-0,005	0	0	1202170	-0,02	0	0	1202209	0,087	0	0
1202118	-0,006	0	0	1202144	0,001	0	0	1202171	-0,025	0	0	1202210	-0,07	0	0
1202119	-0,003	0	0	1202145	-0,012	0	0	1202172	-0,024	0	0	1202211	0,219	0	0
1202120	0,015	0	0	1202146	-0,01	0	0	1202173	-0,024	0	0	1202212	0,029	0	0
1202121	0,001	0	0	1202147	-0,005	0	0	1202174	-0,012	0	0	1202213	0,004	0	0
1202122	0,003	0	0	1202148	0,008	0	0	1202175	-0,022	0	0	1202214	-0,103	0	0
1202123	-0,001	0	0	1202149	0,007	0	0	1202176	-0,018	0	0	1202215	0,285	0	0
1202124	0,043	0	0	1202150	0	0	0	1202177	-0,018	0	0	1202216	-0,045	0	0
1202125	-0,004	0	0	1202151	-0,006	0	0	1202178	-0,022	0	0	1202217	0,004	0	0
1202126	0,042	0	0	1202152	-0,009	0	0	1202179	-0,025	0	0	1202218	-0,045	0	0
1202127	0,007	0	0	1202153	0,001	0	0	1202180	-0,024	0	0	1202219	0,045	0	0
1202128	-0,007	0	0	1202154	-0,007	0	0	1202181	-0,024	0	0	1202220	0,029	0	0
1202129	-0,012	0	0	1202155	-0,009	0	0	1202195	-0,012	0	0	1202221	-0,004	0	0
1202130	-0,009	0	0	1202156	-0,003	0	0	1202196	-0,008	0	0	1202222	-0,054	0	0
1202131	-0,01	0	0	1202157	-0,008	0	0	1202197	-0,007	0	0	1202223	-0,045	0	0
1202132	-0,008	0	0	1202158	0,005	0	0	1202198	0,013	0	0	1202224	-0,079	0	0
1202134	0,007	0	0	1202159	0,002	0	0	1202199	-0,007	0	0	1202225	0,112	0	0
1202135	-0,004	0	0	1202160	-0,018	0	0	1202200	-0,014	0	0	1202226	-0,079	0	0
1202136	-0,006	0	0	1202161	-0,01	0	0	1202202	-0,018	0	0	1202227	0,136	0	0

Laboreergebnisse Betrieb 3, 0 = negativ; 1 = positiv

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1203001	-0,007	0	0	1203026	0,068	0	0	1203051	0,005	0	0	1203084	0,004	0	0
1203002	0,018	0	0	1203027	0,145	0	0	1203056	0,018	0	0	1203085	-0,005	0	0
1203003	0,043	0	0	1203028	0,037	0	0	1203057	0,002	0	0	1203086	0,002	0	0
1203004	0,011	0	0	1203029	0,064	0	0	1203058	0,022	0	0	1203087	0,224	0	0
1203005	0,001	0	0	1203030	0,043	0	0	1203059	0,005	0	0	1203088	0,017	0	0
1203006	0,057	0	0	1203031	0,075	0	0	1203060	0,184	0	0	1203089	0,053	0	0
1203007	0,001	0	0	1203032	0,016	0	0	1203061	0,212	0	0	1203090	0,105	0	0
1203008	0,002	0	0	1203033	-0,002	0	0	1203062	0	0	0	1203091	0,007	0	0
1203009	0,548	1	0	1203034	0,205	0	0	1203063	-0,006	0	0	1203092	0,423	1	0
1203010	0,16	0	0	1203035	0,33	0	0	1203064	0	0	0	1203093	0,028	0	0
1203011	-0,003	0	0	1203036	0,006	0	0	1203065	0,368	0	0	1203094	0,006	0	0
1203012	0,024	0	0	1203037	0,046	0	0	1203066	0,006	0	0	1203095	-0,004	0	0
1203013	-0,004	0	0	1203038	0,159	0	0	1203067	0,196	0	0	1203096	0,61	1	0
1203014	0,03	0	0	1203039	0,003	0	0	1203068	0,109	0	0	1203097	0,357	0	0
1203015	0,001	0	0	1203040	0,004	0	0	1203069	0,045	0	0	1203098	0,042	0	0
1203016	0,117	0	0	1203041	0,003	0	0	1203070	0,004	0	0	1203099	0,01	0	0
1203017	0,005	0	0	1203042	0,037	0	0	1203071	0,028	0	0	1203100	0,009	0	0
1203018	0,01	0	0	1203043	0,032	0	0	1203072	-0,002	0	0	1203101	0,013	0	0
1203019	0,002	0	0	1203044	0,002	0	0	1203073	0,001	0	0	1203102	0,023	0	0
1203020	0,003	0	0	1203045	0,104	0	0	1203078	0,012	0	0	1203103	0,004	0	0
1203021	-0,003	0	0	1203046	-0,001	0	0	1203079	0,003	0	0	1203104	-0,002	0	0
1203022	0,001	0	0	1203047	0,037	0	0	1203080	0,009	0	0	1203105	0,679	1	0
1203023	0,095	0	0	1203048	-0,002	0	0	1203081	0,009	0	0	1203106	0,025	0	0
1203024	-0,002	0	0	1203049	0,003	0	0	1203082	0,253	0	0	1203107	0,004	0	0
1203025	-0,003	0	0	1203050	0,005	0	0	1203083	-0,006	0	0	1203108	0,004	0	0

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1203109	-0,003	0	0
1203110	0	0	0
1203111	0,014	0	0
1203112	0,358	0	0
1203113	0,042	0	0
1203114	-0,008	0	0
1203115	-0,007	0	0
1203116	0,145	0	0
1203117	-0,009	0	0
1203118	-0,001	0	0
1203119	0,104	0	0
1203120	-0,011	0	0
1203121	-0,011	0	0
1203122	-0,004	0	0
1203123	0,024	0	0
1203124	-0,007	0	0
1203125	-0,002	0	0
1203052	0,052	0	0
1203053	0,007	0	0
1203054	0,003	0	0
1203055	0,003	0	0
1203074	0,003	0	0
1203075	0,05	0	0
1203076	0,01	0	0
1203077	-0,002	0	0
1203127	0	0	0

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1203128	-0,009	0	0
1203129	-0,014	0	0
1203130	-0,007	0	0
1203131	-0,012	0	0
1203132	-0,016	0	0
1203134	0,005	0	0
1203135	-0,015	0	0
1203136	0,016	0	0
1203137	-0,017	0	0
1203138	0,006	0	0
1203139	-0,012	0	0
1203140	-0,008	0	0
1203141	-0,002	0	0
1203142	-0,009	0	0
1203143	-0,001	0	0
1203144	-0,005	0	0
1203145	-0,012	0	0
1203146	-0,005	0	0
1203147	-0,012	0	0
1203148	-0,018	0	0
1203149	-0,013	0	0
1203150	-0,015	0	0
1203151	0,003	0	0
1203152	-0,003	0	0
1203153	-0,002	0	0
1203167	0,066	0	0

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1203168	-0,022	0	0
1203169	0	0	0
1203170	-0,016	0	0
1203171	0,003	0	0
1203172	-0,01	0	0
1203173	0,006	0	0
1203174	0,008	0	0
1203175	0,025	0	0
1203176	0,026	0	0
1203177	0,045	0	0
1203178	0,02	0	0
1203179	-0,004	0	0
1203180	-0,013	0	0
1203181	-0,009	0	0
1203182	-0,009	0	0
1203183	-0,002	0	0
1203184	-0,008	0	0
1203052	0,052	0	0
1203053	0,007	0	0
1203054	0,003	0	0
1203055	0,003	0	0
1203074	0,003	0	0
1203075	0,05	0	0
1203076	0,01	0	0
1203077	-0,002	0	0
1203127	0	0	0

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1203128	-0,009	0	0
1203129	-0,014	0	0
1203130	-0,007	0	0
1203131	-0,012	0	0
1203132	-0,016	0	0
1203134	0,005	0	0
1203135	-0,015	0	0
1203136	0,016	0	0
1203137	-0,017	0	0
1203138	0,006	0	0
1203139	-0,012	0	0
1203140	-0,008	0	0
1203141	-0,002	0	0
1203142	-0,009	0	0
1203143	-0,001	0	0
1203144	-0,005	0	0
1203145	-0,012	0	0
1203146	-0,005	0	0
1203147	-0,012	0	0
1203148	-0,018	0	0
1203149	-0,013	0	0
1203150	-0,015	0	0
1203151	0,003	0	0
1203152	-0,003	0	0
1203153	-0,002	0	0
1203154	-0,037	0	0

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1203155	-0,054	0	0
1203156	0,054	0	0
1203157	0,062	0	0
1203158	0,021	0	0
1203159	-0,029	0	0
1203160	-0,136	0	0
1203161	0,087	0	0
1203162	0,037	0	0
1203163	-0,045	0	0
1203164	-0,079	0	0
1203165	-0,070	0	0
1203167	0,066	0	0
1203168	-0,022	0	0
1203169	0	0	0
1203170	-0,016	0	0
1203171	0,003	0	0
1203172	-0,01	0	0
1203173	0,006	0	0
1203174	0,008	0	0
1203175	0,025	0	0
1203176	0,026	0	0
1203177	0,045	0	0
1203178	0,02	0	0
1203179	-0,004	0	0
1203180	-0,013	0	0
1203181	-0,009	0	0
1203182	-0,009	0	0

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1203183	-0,002	0	0
1203184	-0,008	0	0
1203185	-0,0289	0	0
1203187	-0,0041	0	0
1203189	-0,1116	0	0
1203190	0,0620	0	0

Laboreergebnisse Betrieb 4, 0 = negativ; 1 = positiv

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR	Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1204001	0,804	1	0	1204022	0,739	1	0	1204043	0,128	0	0	1204064	0,274	0	0
1204002	0,258	0	0	1204023	0,273	0	0	1204044	0,335	0	0	1204065	0,977	1	0
1204003	0,013	0	0	1204024	0,503	1	0	1204045	0,917	1	0	1204066	0,109	0	0
1204004	0,478	1	0	1204025	0,195	0	0	1204046	0,149	0	0	1204067	0,202	0	0
1204005	0,015	0	0	1204026	0,399	1	0	1204047	0,178	0	0	1204068	0,47	1	0
1204006	0,462	0	0	1204027	0,022	0	0	1204048	0,018	0	0	1204069	0,402	1	0
1204007	0,119	0	0	1204028	0,375	0	0	1204049	0,27	0	0	1204070	0,114	0	0
1204008	0,246	1	0	1204029	0,335	0	0	1204050	0,321	0	0	1204071	0,242	0	1
1204009	0,494	1	0	1204030	1,69	1	0	1204051	0,315	0	0	1204072	0,101	0	0
1204010	0,087	0	0	1204031	0,73	1	0	1204052	1,011	1	0	1204073	0,444	1	1
1204011	0,058	0	0	1204032	0,394	0	0	1204053	0,302	0	0	1204074	1,267	1	0
1204012	0,127	0	0	1204033	0,156	0	0	1204054	0,387	0	0	1204075	1,203	1	0
1204013	0,293	0	0	1204034	0,898	1	0	1204055	0,717	1	0	1204076	1,034	1	0
1204014	0,666	1	0	1204035	0,084	0	0	1204056	0,044	0	0	1204077	0,829	1	0
1204015	0,264	0	0	1204036	1,157	1	0	1204057	0,193	0	0	1204078	0,209	0	0
1204016	0,46	1	0	1204037	0,134	0	0	1204058	0,041	0	0	1204079	0,99	1	0
1204017	2,335	1	0	1204038	0,388	0	0	1204059	0,064	0	0	1204080	0,851	1	0
1204018	1,028	1	0	1204039	0,255	0	1	1204060	0,148	0	0	1204081	0,157	0	0
1204019	0,529	1	0	1204040	0,87	1	0	1204061	0,795	1	0	1204082	0,029	0	0
1204020	0,26	0	0	1204041	0,084	0	1	1204062	0,48	1	0	1204083	0,121	0	0
1204021	1,163	1	0	1204042	0,122	0	0	1204063	0,088	0	0	1204084	0,046	0	0

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1204085	0,191	0	0
1204086	0,234	0	0
1204087	0,369	0	0
1204088	0,309	0	0
1204089	0,142	0	0
1204090	0,517	1	0
1204091	0,147	0	0
1204092	1,069	1	0
1204093	0,041	0	0
1204094	0,341	0	0
1204095	0,241	0	0
1204096	0,31	0	0
1204097	1,417	1	0
1204099	1,177	1	1
1204100	0,723	1	1
1204101	3,17	1	0
1204102	3,29	1	0
1204103	3,437	1	0
1204104	1,563	1	0
1204105	0,123	0	1
1204106	0,312	0	0
1204107	2,054	1	0
1204108	0,915	1	0
1204109	1,596	1	0
1204110	1,625	1	1
1204111	0,925	1	1

Proben-ID	ELISA Ratio	ELISA	PCR
1204112	0,7	1	1
1204113	1	1	1
1204114	0,76	1	0
1204115	1,166	1	1
1204116	0,894	1	0
1204117	1,12	1	1
1204118	1,47	1	0
1204119	2,623	1	0
1204120	2,961	1	0